

Aus der Abteilung für Allgemeine, Thorax-, Gefäß- und  
Transplantationschirurgie der  
Chirurgischen Klinik und Poliklinik der  
Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. E. Klar

**Short Tandem Repeat-basierte Genotypisierung der HRO-Tumormodelle:  
Etablierung und Ergebnisse**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von  
Christina Irena Stiller  
aus Kaiserslautern

Rostock, 2017

Dekan: Prof. Dr. med. E. C. Reisinger

**Gutachter:**

1. Gutachter:  
Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Hinz  
Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Rostock
2. Gutachter:  
Prof. Dr. Oliver Krämer  
Institut für Toxikologie, Universität Mainz
3. Gutachter:  
PD Dr. rer. nat. Michael Linnebacher  
Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Universität Rostock

**Datum der Einreichung:** 26.06.2017

**Datum der Verteidigung:** 25.04.2018

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	1
1.1	Das Kolorektale Karzinom (CRC)	1
1.2	Zu DNA-Profilng und Short Tandem Repeats (STRs)	3
1.3	Der zelluläre Fingerabdruck	5
1.4	Ziel dieser Arbeit	8
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	8
2.1	Material	8
2.1.1	Die Proben	8
2.1.2	Chemikalien	9
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	10
2.1.4	Geräte	10
2.1.5	Software	11
2.1.6	Primer	11
2.2	Methoden	13
2.2.1	Schritt 1: Gewinnung genomischer DNA (gDNA)	13
2.2.2	Schritt 2: Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der gDNA	14
2.2.3	Schritt 3: RPS9 spezifische PCR und Agarose-Gelelektrophorese	14
2.2.4	Schritt 4: Multiplex - und Monoplex – PCR	17
2.2.5	Schritt 5: Kapillarelektrophorese	20
2.2.6	Schritt 6: Arbeit mit der GeneMapper® - Software	21
	2.2.6.1 DNA-Marker	22
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	25
3.1	Non-MSI	26
3.2	MSI	36
3.3	LOH	42
3.4	Neue Allele	49
3.5	Genotypisierung weiterer (nicht HROC-) Proben	54
3.6	Amelogenin	54
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	55
4.1	Tumormodelle und die Frage: Wie entsteht Krebs?	56

4.2	STR-Profile bei Tumorzellen: Was ist besonders?.....	58
4.3	LOH.....	60
4.4	MSI.....	70
4.5	Zu den Ergebnissen der Geschlechtsbestimmung .....	80
4.6	Kritik Teil 1, oder wie es zu den zahlreichen Punktallelen kam .....	82
4.7	Abgleich mit externen Daten.....	84
4.7.1	<i>Abgleich mit STR-Profilen der DSMZ</i> .....	84
4.7.2	<i>Abgleich mit STR-Profilen aus Turin</i> .....	90
4.8	Kritik Teil 2: Fehleranalyse.....	90
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>104</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>106</b>
<b>10</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>115</b>
10.1	Thesen.....	141
10.2	Lebenslauf .....	142
10.3	Eidesstattliche Erklärung .....	143
10.4	Danksagung .....	144

## 1 Einleitung

Zelllinien werden schon seit Jahrzehnten als Tumormodelle in der Krebsforschung eingesetzt, und sehr wahrscheinlich werden sie auch in Zukunft ein wichtiger Bestandteil der präklinischen Forschung sein. Diese Arbeit soll mittels STR-basierter Genotypisierung als eine Art Qualitätskontrolle dazu beitragen, mögliche Fälle von Probenvertauschungen bei den Rostocker Tumormodellen der HRO-Kollektion (HRO: Hansestadt Rostock) aufzudecken.

So empfiehlt eine Expertenkommission der ATCC (American Type Culture Collection) ein regelmäßiges Überprüfen der Identität verwendeter Zelllinien, insbesondere im Kontext individualisierter Therapie und Stammzelltherapie, um mit falschen Ergebnissen verbundene Therapieirrtümer zu verhindern (Masters und Mitglieder der Arbeitsgruppe ASN-0002 der ATCC SDO 2010).

In diesem Sinne wurden 395 Proben der AG Molekulare Onkologie und Immuntherapie (MOI) der Universität Rostock genotypisiert. Das System hierfür wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Basierend auf den einzelnen Arbeitsschritten entstand ferner eine Labor-SOP zur Durchführung solcher Fingerprint-Analysen.

Da es sich mehrheitlich um Proben des Kolorektalen Karzinoms handelte, wird diese Tumorentität im Folgenden kurz vorgestellt.

### 1.1 Das Kolorektale Karzinom (CRC)

Im Jahr 2012 starben in Deutschland 13.772 Männer und 12.200 Frauen an Darmkrebs. Die Anzahl der Darmkrebs-Neuerkrankungen belief sich im selben Jahr für Männer auf 33.740 und für Frauen auf 28.500. Damit lag Darmkrebs bei den Krebsneuerkrankungen an dritter Stelle bei den Männern (13,4%), hinter dem Prostatakarzinom (25,3%) und Lungenkrebs (13,7%). Bei den Frauen waren im selben Jahr nur Krebsneuerkrankungen an der Brustdrüse häufiger (Brustkrebs 30,8%, Darmkrebs 12,6%). Auch weltweit lag die Inzidenz für Darmkrebs in 2012 bei Männern an dritter und bei Frauen an zweiter Stelle, wobei über die Hälfte der Fälle in den besser entwickelten Regionen dieser Erde auftraten. (Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2015; International Agency for Research on Cancer 2015).

Laut Robert Koch-Institut ist bei 60% der Darmkrebs-Erkrankungen das Kolon betroffen, bei 30 % das Rektum. Ungefähr 80% der CRC-Fälle sind sporadisch, während bei den übrigen 20% eine genetische Komponente eine Rolle zu spielen scheint (Giardiello et al. 2001). Meist ist Darmkrebs eine Erkrankung des älteren Menschen. So lag das mittlere Erkrankungsalter in Deutschland zuletzt bei 72 Jahren für Männer und 75 Jahren für Frauen (Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2015). Als Erkrankungsursache konnten laut Giardiello et al. für 5-6% der CRCs Keimbahnmutationen gefunden werden. Die betroffenen Patienten sind oft jünger, haben ein hohes Lebenszeitrisko für die Erkrankung und in der Regel eine positive Familiengeschichte für Darmkrebs. Die häufigste Form des hereditären CRC ist das Lynch-Syndrom (LS). Dieses autosomal dominant vererbte Tumor-Syndrom macht 2-3 % aller CRC-Fälle aus und geht nicht nur mit einer Prädisposition für das CRC, sondern auch für Endometrium- und Ovarialkarzinom, sowie Magen-, Urothel-, Pankreas-Karzinom und weitere Tumorentitäten einher (Steinke et al. 2014). Beim LS liegt eine inaktivierende monoallelische Keimbahnmutation in einem der vier DNA Mismatch Repair (MMR) - Gene MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 vor, wobei das zweite Allel in Tumorzellen durch Punktmutationen oder Verlust der Heterozygotizität ebenfalls seine Funktion verliert. Eine weitere mögliche Ursache sind Keimbahnmutationen (Deletionen) im EPCAM-Gen. Selten können auch biallelische Keimbahnmutationen in einem der vier MMR-Gene vorkommen, man spricht dann von „Constitutional MMR deficiency“, kurz CMMRD (Senter et al. 2008; Shia 2015). Übrigens wird laut Shia der Begriff LS heutzutage im Zusammenhang mit CRC-Patienten verwendet, die Keimbahnmutationen aufweisen, während man bei den 2-5% der CRC-Patienten, die die Amsterdam-Kriterien erfüllen, von HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer) spricht.

Schließlich gibt es noch das seltenere autosomal dominant vererbte Syndrom familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), das ca. 1% der CRC-Fälle ausmacht und meist auf Keimbahnmutationen des Tumorsuppressor-Gens APC zurückzuführen ist. Hier entwickeln Patienten im gesamten Bereich des Kolons zahlreiche Adenome, während das LS normalerweise von einer einzigen kolorektalen Läsion ausgeht (Giardiello et al. 2001).

### 1.2 Zu DNA-Profiling und Short Tandem Repeats (STRs)

DNA-Typing - oder DNA-Profiling - ist eine Methode, die in der Forensik entstand und in forensischen Laboren weltweit genutzt wird, um DNA-Spuren von Tatorten zu analysieren und letztendlich mit Hilfe des erstellten DNA-Profils Täter zu überführen.

Es war ein langer Weg bis es soweit kam, dass heutzutage nach standardisierten Verfahren aus einer winzigen DNA-Menge innerhalb weniger Stunden ein DNA-Profil erstellt werden kann. Diesen Weg beschreibt John M. Butler in seinem Buch „Forensic DNA typing“ (Butler 2001). Er schildert dort, dass alles in den 80er Jahren mit dem Genetiker Alec Jeffreys begann, der entdeckte, dass es auf der DNA Sequenzen gibt, die sich wiederholen, und auch, dass die Anzahl dieser sich wiederholenden Bereiche bei Individuen eben nicht identisch ist, sondern sich unterscheidet. Die Sequenzen wurden VNTRs genannt, für Variable Number of Tandem Repeats. Die Methode, die Jeffreys zur Analyse dieser Sequenzen entwickelte, und mit der sich menschliche Identitätstest machen lassen, heißt RFLP, für Restriktions Fragment Längen Polymorphismus.

Inzwischen ist dieses Verfahren aber nicht mehr der Goldstandard zur Erstellung von DNA-Profilen in forensischen Laboren. Butler schreibt, dass dieses Verfahren zwar den Vorteil hatte, eine große Diskriminationskraft zu besitzen, dass die Erstellung eines Profils aber andererseits sehr aufwendig war. Ferner konnte das Verfahren nicht leicht automatisiert werden, was ein entscheidender Nachteil ist, da es weltweit einen großen Bedarf an DNA-Profiling gibt. Jedenfalls gibt es ein Verfahren, das sich gut automatisieren ließ, für ein Labor einen vergleichsweise geringen Aufwand bedeutet und vor allem trotzdem eine große Diskriminationskraft aufweist, und zwar das STR-Profiling.

STR steht für Short Tandem Repeat und gemeint sind kurze, repetitive DNA-Sequenzen von 1-6 Basenpaare (bp) Länge, die auch als Mikrosatelliten bezeichnet werden. STRs, die nach den Mendelschen Regeln vererbt werden (Dirks und Drexler 2003) , können ebenfalls zur Identitätsprüfung genutzt werden, weil die Anzahl der sich wiederholenden Einheiten von Individuum zu Individuum unterschiedlich ist. Auch handelt es sich beim STR-Profiling um ein schnelles Verfahren, eben dadurch dass die Sequenzen kurz sind, und es heutzutage außerdem technisch möglich ist, mehrere STR-Loci gleichzeitig in sog. Multiplex-PCRs zu analysieren (Butler 2001). Zum Vergleich: Es gibt auch Minisatelliten. Die Länge der sich wiederholenden Einheiten beträgt hier bis zu 25 bp (Brown 2007, S.75). In seinem Buch hat Butler zur besseren Visualisierung der bisher erwähnten DNA-Typisierungstechnologien eine

Graphik entworfen, die in Abbildung 1 zu sehen ist. Auf der x-Achse ist die Schnelligkeit des jeweiligen Analyseverfahrens dargestellt, die y-Achse zeigt die Diskriminationskraft. Die STR-Methode mit ihrer Schnelligkeit und hohen Diskriminationskraft findet sich im rechten oberen Quadranten.

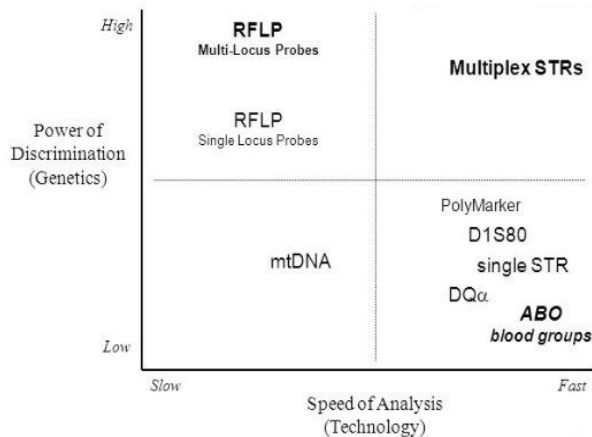


Abbildung 1: Vergleich von DNA-Typing Technologien (Butler 2001)

Dass DNA-Profilung im Vergleich zu den 80er Jahren inzwischen in wenigen Stunden möglich ist, liegt laut Butler auch an Fortschritten auf dem Gebiet der Fluoreszenzmarkierung, und vor allem an besseren Rechnerleistungen. Allein von 1985, als Jeffreys seine RFLP-Methode entwickelte, bis zum Jahr 2000, in dem die Labore des FBI – sie betreiben in den Vereinigten Staaten hauptsächlich forensische Analysen – komplett vom RFLP-System auf Multiplex-PCRs umstellten, hat sich die Prozessorgeschwindigkeit von Computern vervierzigfacht. Im Vergleich zu 1985 arbeiten Prozessoren schließlich im Jahr 2016 fast 200fach so schnell.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass es noch weitere Methoden gibt, mit denen z.B. Fälle von Kreuzkontaminationen bei Zelllinien aufgedeckt werden können. Da wären z.B. die Isoenzym-Analyse und die Karyotypisierung. Auch gibt es noch die HLA- und die Immuntypisierung. All diese Verfahren, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, haben aber nicht die gleiche Diskriminationskraft und ihre Untersuchungsergebnisse sind nicht in dem Maße reproduzierbar, als dass man sie in einer standardisierten Referenzdatenbank verwenden könnte (Masters und Mitglieder der Arbeitsgruppe ASN-0002 der ATCC SDO 2010).



Aber um noch einmal auf den Bedarf an DNA-Profilen zurückzukommen: dieser ist groß, weil auch das Einsatzgebiet von DNA-Profilen vielfältig ist. Abgesehen von Analysen in der Forensik kann die STR-basierte Genotypisierung für Abstammungsanalysen und Vaterschaftstests eingesetzt werden, zur Diagnose erblich bedingter Krankheiten und erblicher Prädispositionen, ferner zur Identifizierung von Mikroorganismen, insbesondere Krankheitserregern (Wrba et al. 2007, S. 55). In diesem konkreten Fall geht es um den zellulären Fingerabdruck.

### 1.3 Der zelluläre Fingerabdruck

Beim sog. zellulären Fingerabdruck geht es darum, mittels des STR-Profiles von Zelllinien deren Identität zu überprüfen. Dass diese Identitätsprüfung notwendig ist, fand man bereits vor mehr als 50 Jahren. Es war der Amerikaner Stanley M. Gartler, der im Jahr 1966 das Konzept des biochemischen Polymorphismus einführte, das eine Unterscheidung von Zelllinien anhand ihrer Isoenzym-Expression ermöglichte (Masters und Mitglieder der Arbeitsgruppe ASN-0002 der ATCC SDO 2010). Zuvor konnte eine falsche Identifizierung von Zelllinien innerhalb einer Spezies gar nicht aufgedeckt werden. Gartler veröffentlichte dann im selben Jahr, dass 18 menschliche Zelllinien vermeintlich unabhängiger Herkunft alle HeLa-Zellen waren, die erste menschliche Krebszelllinie, deren Etablierung geglückt war (Masters und Mitglieder der Arbeitsgruppe ASN-0002 der ATCC SDO 2010). Interessant war die Reaktion der wissenschaftlichen Gemeinschaft auf diese Veröffentlichung. Gartler erhielt Anfeindungen, genauso wie Walter Nelson-Rees. Er konnte mit einer neuen Karyotypisierungs-Methode, die er selbst mitentwickelt hatte, nachweisen, dass es sich bei so mancher Zelllinie, die seinem Institut als vermeintlich einzigartige Probe zugeschickt wurde, in Wahrheit ebenfalls um HeLa-Zellen handelte (Masters und Mitglieder der Arbeitsgruppe ASN-0002 der ATCC SDO 2010). Es blieb nicht nur bei verbalen Angriffen der Kollegen nach den Veröffentlichungen von Nelson-Rees, ihm wurde schließlich sogar seine Stelle gekündigt. Und es sollte noch Jahrzehnte so weiter gehen, dass Fälle von Kreuzkontaminationen zwar in einer gewissen Regelmäßigkeit an die Öffentlichkeit gelangten, dass daraus aber keine Konsequenzen gezogen wurden, weil unterschiedliche Akteure ihre eigenen Interessen vertraten. Die Wissenschaftler wollten sich scheinbar in vielen Fällen nicht eingestehen, dass tatsächlich sie es waren, die mit “falschen“ Zellen gearbeitet und somit auch Ergebnisse produziert hatten, die eigentlich so nicht haltbar waren. Die Zeitschriften zierten sich zu reagieren und eine Zelllinien-Überprüfung

standardmäßig vor Publikationen einzufordern, da sie fürchteten, es könnten dann weniger Manuskripte eingereicht werden. Schließlich hieß es, es müssten erst die Geldgeber reagieren und entsprechende Gelder bereitstellen. Letztere waren von solchen Forderungen nicht begeistert. Und so wurde ignoriert und verleugnet und in der Zwischenzeit weiter publiziert. All das schildern Masters und Kollegen eindrücklich in ihrem Artikel aus 2010, und führen Beispiele wie dieses an: „Die vermeintlichen menschlichen Prostatakrebs-Zelllinien TSu-Pr1 und JCA-1 kommen auch von T24 Blasenkarzinom-Zellen. Diese Erkenntnisse wurden in Cancer Research publiziert, aber das verhinderte nicht, dass TSu-Pr1 Zellen in einem späteren Paper in Cancer Research als Modell für Prostatakrebszellen benutzt wurden.“ (Masters und Mitglieder der Arbeitsgruppe ASN-0002 der ATCC SDO 2010).

In Abbildung 2 geht es erneut um T24 Blasenkarzinom-Zellen. Sie verbargen sich in Wahrheit auch hinter der Endothelzelllinie ECV 304. Doch obwohl diese Tatsache 1999 bekannt gemacht wurde, kam es weiterhin zu Veröffentlichungen, die auf T24 Zellen als Modell für Endothelzellen basierten. Roderick MacLeod von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) in Braunschweig hat die Anzahl dieser Zitate ermittelt und auf der y-Achse der folgenden Graphik dargestellt. Auf der x-Achse sind die Jahre zu sehen, in denen die Zitate publiziert wurden.

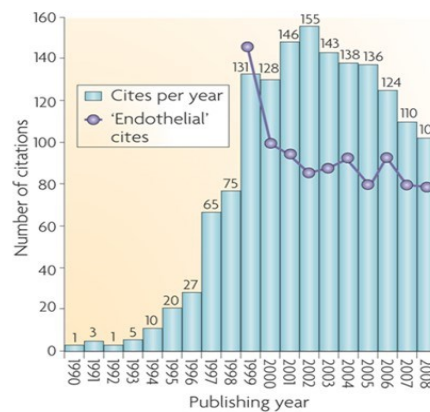


Abbildung 2: Zitate, in denen von T24 Blasenkarzinom-Zellen als normale Endothelzellen gesprochen wurde (Masters und Mitglieder der Arbeitsgruppe ASN-0002 der ATCC SDO 2010)

Somaschini et al. beschreiben, dass 16-35% aller in unterschiedlichen Laboren weltweit genutzter Zelllinien falsch identifiziert oder durch andere Zelllinien kreuzkontaminiert sind (Somaschini et al. 2013). Was ist die Konsequenz? Eingangs wurde bereits erwähnt, dass Patienten Schaden nehmen können. Und wenn basierend auf vertauschten Zelllinien Daten erhoben werden, die schlichtweg falsch sind, dann ist nicht nur das in diese Forschung investierte Geld falsch investiertes Geld, es kommt auch mit der Zeit zu einem Vertrauensverlust, unter dem die Wissenschaft insgesamt leidet.

Es ist also wichtig, dass Labore auf sauberes Arbeiten achten, da es ansonsten zu Vertauschungen und Kreuzkontaminationen kommen kann, wobei Fehler oft im Ursprungslabor einer Zelllinie passieren (Dirks 2010). Das Zellmaterial kann durch direkten Kontakt oder als Aerosol übertragen werden, aber am Wahrscheinlichsten über Arbeitsmaterialien wie Pipetten oder kontaminiertes Medium. Ferner können Zellkulturflaschen vertauscht oder falsch etikettiert werden (Capes-Davis et al. 2010). Laut Berglind et al. ist es so, dass in so manchem Material- und Methodenteil wissenschaftlicher Arbeiten steht, die verwendeten Zelllinien würden aus Zellbanken wie ATCC oder der DSMZ stammen. Tatsächlich hätten die Forscher die Zelllinien aber nicht selten von anderen Arbeitsgruppen bekommen (Berglind et al. 2014). Wenn man Zelllinien untereinander weitergibt, dann sollten Qualitätskontrollen durchgeführt werden, wofür sich das STR-Typing anbietet. Manche Autoren raten dazu, eine Qualitätskontrolle nicht nur eingangs durchzuführen, sondern – wenn man längere Studien mit Zelllinien macht – die Zelllinienüberprüfung in Zeiträumen von drei bis sechs Monaten zu wiederholen (Freshney 2010). Was das praktische Vorgehen betrifft, so raten Capes- Davis et al. dazu, die Literatur nach den jüngsten Fällen von Kreuzkontaminationen zu durchforsten. Im Jahr 2010 haben Amanda Capes-Davis und Ian Freshney eine Zusammenstellung von kontaminierten oder falsch identifizierten Zelllinien ins Leben gerufen. Diese Datensammlung wird heute vom International Cell Line Authentication Committee (ICLAC) gepflegt und aktualisiert und findet sich unter: <http://iclac.org/databases/cross-contaminations/>. Außerdem wurde ein großer Teil der Daten in die Bio Samples Datenbank des NCBI integriert bzw. ist auch mit dieser verlinkt: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/>. Man kann dort nach der Zelllinie suchen, mit der man arbeiten möchte. Auch kann man in der Datenbank die STR-Profile einiger Zelllinien einsehen.

### 1.4 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, im Sinne einer Qualitätskontrolle eventuelle Probenvertauschungen im Labor der AG MOI der Universität Rostock aufzudecken. Hierfür wurde der DNA Fingerprint im Labor etabliert und STR-basiert eine Genotypisierung der HRO-Tumormodelle durchgeführt. Insgesamt wurden 395 Proben genotypisiert, hauptsächlich CRC-Proben. STRs werden üblicherweise in der Forensik eingesetzt. Allerdings unterscheidet sich das Probengut des MOI-Labors mit seinen Tumorzelllinien und Xenografts deutlich von dem Probengut, das man üblicherweise in der Forensik findet. Und so spielten bald Phänomene wie der Verlust der Heterozygotizität beim Tumormaterial oder das Auftauchen neuer Allele eine Rolle. Aufgrund dieser Phänomene unterscheiden sich die STR-Profile von Tumor-Proben und ihrem korrespondierenden Normalgewebe im MOI-Labor nicht selten bei einem oder mehreren Markern. Diese Phänomene galt es zu erfassen, weil sie auch der Schlüssel zum Verständnis der Unterschiede zwischen den STR-Profilen der einzelnen untersuchten "Materialien" eines Probenblocks (bezeichnet alle biologischen Proben, die von einem Patienten stammen) sind.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Die Proben

Die meisten Proben wurden von der AG MOI [Klinik für Allgemeinchirurgie] der Universität Rostock zur Verfügung gestellt. Es handelte sich entweder um Zellpellets, die bei ca. -150°C mit Hilfe von Flüssigstickstoff gelagert wurden, oder um bereits aus frisch gefrorenem Gewebe oder Paraffin eingebettetem Material isolierte gDNA, die bei -25°C gelagert wurde. Wird in der Klinik für Allgemeinchirurgie ein CRC reseziert, so wird das Resektat im Anschluss zur weiteren Analyse in das Institut für Pathologie der Universität Rostock gegeben. Daher stammt das in dieser Arbeit untersuchte Original-Tumormaterial - meist Adenokarzinome - aus der Pathologie. Ferner wird immundefizienten Mäusen zur Generierung von Xeno-Tumormodellen Tumormaterial transplantiert. Aus dem Xeno-Tumormaterial werden wiederum Zelllinien etabliert. So konnten für diese Arbeit auch Xeno-Proben bearbeitet werden.

Hauptsächlich untersucht wurde:

- **Patientenmaterial:**
  - Normalgewebe (N)
  - Tumor infiltrierende B-Zellen (TiBc)
  - B-Zellen (Lymphozyten) aus dem Patientenblut , z.B. BcHROC24 P25
  - Originaltumor (T)
  - Primärzelllinie (wenn Etablierung geglückt), z.B. HROC24 P25
- **Xenomaterial (Maus):**
  - PDX (Patient-Derived Xenograft) , z.B. HROC24 T1 M1
  - PDX-abgeleitete Zelllinie, z.B. HROC24 T1 M1 P22

Bei den unter Patientenmaterial aufgeführten Zelllinien handelt es sich um adhärenente humane Zellen des CRC in kontinuierlicher Kultur. HROC steht für die in der HRO-Kollektion enthaltenen CRCs; es wurden insgesamt 350 HROC-Proben untersucht.

Mehrheitlich handelt es sich um sporadische Fälle des CRC. Folgende Proben sind hingegen HNPCC-Proben: HROC29 (Einzelprobe), HROC71 (Einzelprobe), HROC113 (Probenblock), HROC252 (Probenblock) und HROC285(Probenblock).

Hinzu kamen 45 diverse Proben, als da wären: HROP (Pankreas-Karzinom), HHC (Hansestadt Hamburg CRC), HROHep (Leberkarzinom), HROBMC (‘‘ Hirnmetastase‘‘ des CRC), HROG (Glioblastom).

Bei den HROG-Proben handelt es sich um fünf Glioblastom-Tumorzelllinie/B-Zell-Paare (WHO Grad IV; erwachsene Patienten). Die weiteren HROG-Tumorzelllinien-Proben, die untersucht wurden, waren Einzelproben. In zwei Fällen lagen lediglich die B-Zell-Proben vor.

### 2.1.2 Chemikalien

Agarose	Sigma-Aldrich (Darmstadt, D)
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
100bp – DNA Ladder	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Bromophenolblau- Natriumsalz	Applichem (Darmstadt, D)

10x Complete Buffer (für S9 PCR)	Bioron (Ludwigshafen, D)
dNTPs	Promega (Madison, USA)
DSF-TAQ DNA Polymerase	Bioron (Ludwigshafen, D)
EDTA	Applichem (Darmstadt, D)
Ethanol (70%, unvergällt), von Ethanol absolut	Zentralapotheke des Universitätsklinikums Rostock
Ethidium bromide solution	Sigma-Aldrich (Darmstadt, D)
GeneScan™-500 LIZ™ Size Standard	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
GeneScan™-500 ROX™ Size Standard	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
Glycerin (50%)	Merck (Darmstadt, D)
Isopropanol	J.T. Baker (Griesheim, D)
MyTaq™ HS DNA Polymerase	Bioline (Luckenwalde, D)
5x MyTaq Reaction Buffer	Bioline (Luckenwalde, D)
Primer	Metabion (Martinsried, D)
Rotiphorese®- 50x TAE Puffer	Carl Roth (Karlsruhe, D)
RNAse	Roboklon (Berlin, D)
RNAse freies Wasser	Sigma-Aldrich (Darmstadt, D)
Wizard® Genomic DNA Purification Kit	Promega (Madison, USA)
Xylencyanol FF	Applichem (Darmstadt, D)

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Klebefolien	Sarstedt (Nümbrecht, D)
MicroAmp® Optical 96-Well	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, D)
Osprint® plate 96	Bilatec (Mannheim, D)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht, D)
PCR Tubes	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, D)
Reagiergefäße	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Thermosprint® Aluminium Heat Seal	Bilatec (Mannheim, D)

### 2.1.4 Geräte

Analytische Waage	Kern & Sohn (Balingen, D)
-------------------	---------------------------

Bio-Rad Sub-Cell® GT	Bio-Rad Laboratories (München, D)
Combi Thermo-sealer	Advanced Biotechnologies (Aichach, D)
Electrophoresis Power Supply Consort EV 231	Sigma-Aldrich (Darmstadt, D)
Eppendorf Centrifuge 5415 D	Eppendorf (Hamburg, D)
Heizblock	Haep Labor Consult (Bovenden, D)
Heraeus® Multifuge 3 S-R	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, D)
Intas Gel Kamera	Science Imaging Instruments (Göttingen, D)
Mikrowelle	Bosch (Stuttgart, D)
MyCycler™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories (München, D)
NanoDrop 1000	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, D)
Pipetten	Gilson (Limburg an der Lahn, D)
Vortex-2-Genie	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Zentrifuge für PCR Tubes	Labnet International (Edison, USA)

### 2.1.5 Software

Foxit PDF Editor
GeneMapper® Version 4.1
Intas-Capture
Microsoft Office 2013
MyCycler Version 1.065

### 2.1.6 Primer

Locus	Primer	Sequenz
VWA	Forward FAM	5'-Fam-GCC CTA GTG GAT GAT AAG AAT AAT CAG TAT GTG-3'
	Reverse	5'-GGA CAG ATG ATA AAT ACA TAG GAT GGA TGG-3'
TH01	Forward FAM	5'-Fam-ATT CAA AGG GTA TCT GGG CTC TGG-3'
	Reverse	5'-GTG GGC TGA AAA GCT CCC GAT TAT-3'
TPOX	Forward FAM	5'-Fam-ACT GGC ACA GAA CAG GCA CTT AGG-3'

	Reverse	5'-GGA GGA ACT GGG AAC CAC ACA GGT TA-3'
CSF1PO	Forward FAM	5'-Fam-AAC CTG AGT CTG CCA AGG ACT AGC-3'
	Reverse	5'-TTC CAC ACA CCA CTG GCC ATC TTC-3'
AMEL	Forward	5'-ACC TCA TCC TGG GCA CCC TGG TT-3'
	Reverse FAM	5'-Fam-AGG CTT GAG GCC AAC CAT CAG-3'

Alle Primer-Sequenzen entsprechen den Angaben unter:  
<http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/kits/PowerPlex1.1.htm>. Stand: Februar 2012.

Für Amelogenin: [http://www.cstl.nist.gov/strbase/promega\\_primers.htm](http://www.cstl.nist.gov/strbase/promega_primers.htm)

Die entsprechenden Auszüge aus der STR-Datenbank finden sich im Anhang dieser Arbeit. Es besteht ein Unterschied die Fluoreszenzmarkierung betreffend: Anders als auf den Listen des NIST wurde – mit der Ausnahme Amelogenin – jeweils der Forward Primer markiert.

Der bei vWA farbig markierte Bereich der Primer-Sequenz findet sich nicht in der Primer-Sequenz, die von der DSMZ genutzt wird (Siehe Diskussion).

Locus	Primer	Sequenz
D5S818	Forward HEX	5'-Hex-GGT GAT TTT CCT CTT TGG TAT CC-3'
	Reverse	5'-AGC CAC AGT TTA CAA CAT TTG TAT CT-3'
D7S820	Forward HEX	5'-Hex-ATG TTG GTC AGG CTG ACT ATG-3'
	Reverse	5'-GAT TCC ACA TTT ATC CTC ATT GAC-3'
D13S317	Forward HEX	5'-Hex-ATT ACA GAA GTC TGG GAT GTG GAG GA-3'
	Reverse	5'-GGC AGC CCA AAA AGA CAG A-3'
D16S539	Forward HEX	5'-Hex-GGG GGT CTA AGA GCT TGT AAA AAG-3'
	Reverse	5'-GTT TGT GTG TGC ATC TGT AAG CAT GTA TC-3'

Der bei D13S317 farbig markierte Bereich der Primer-Sequenz findet sich ebenfalls nicht in der Primer-Sequenz, die von der DSMZ in Braunschweig genutzt wird.

Auch hier entsprechen alle Primer-Sequenzen den Angaben unter:  
<http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/kits/PowerPlex1.1.htm>. Stand: April 2013 -



und es besteht ein Unterschied bei der Fluoreszenzmarkierung: bei D5S818, D13S317 und D16S539 wurden anders als auf den Listen des NIST jeweils die Forward Primer markiert.

In den einzelnen STR-Systemen bewegen sich die Produktgrößen in folgendem Bereich:

VWA: 120 – 170 bp; TH01: 180 – 220 bp; TPOX: 220 – 260 bp;

CSF1PO: 270 – 330 bp; AMEL: X -> 210,4; Y -> 216,7 bp;

D5S818: 100 – 152 bp; D13S317: 153 – 200 bp; D7S820: 201 – 252 bp

D16S539: 253 – 302 bp

Für weitere Informationen zu den Primern: Siehe Tabelle 27 im Anhang.

## 2.2 Methoden

Zur besseren Übersicht wurde der Arbeitsprozess in sechs Schritte unterteilt, die im Folgenden nacheinander behandelt werden.

### 2.2.1 Schritt 1: Gewinnung genomischer DNA (gDNA)

Zur gDNA Gewinnung wurde der Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA) verwendet. Das Grundprinzip ist, dass Zellen zunächst chemisch durch Lyse mit Detergenzien aufgebrochen werden, um die gDNA freizusetzen. Diese wird dann durch Extraktion und Präzipitation gereinigt (Wrba et al. 2007). Bis zur weiteren Verwendung wird die gDNA im MOI-Labor bei -25 °C gelagert. Nach der Hersteller-Empfehlung und einer darauf basierenden Labor-SOP wurde bei der Bearbeitung von Zellpellets wie folgt vorgegangen:

Das Zellpellet wurde bei 90° C 10 min inkubiert. Zur Lyse erfolgte dann zunächst die Zugabe von 600µl „Nuclei Lysis Solution“, schließlich von 3µl RNase. Die Probe wurde im Anschluss geschwenkt, 30 min bei 37°C inkubiert und dann 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es folgte die Zugabe von 200µl „Protein Precipitation Solution“, und nach 20 s auf dem Vortex-Gerät eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Die Probe wurde dann 4 min auf höchster Stufe zentrifugiert, wonach das Protein als weißes Pellet sichtbar wurde. Der die gDNA enthaltende Überstand wurde abgenommen und in ein 1,5ml Reagiergefäß gegeben, in dem bereits 600µl Isopropanol vorgelegt worden waren. Diese Mischung wurde nach vorsichtigem

Schwenken 1 min auf höchster Stufe zentrifugiert. Die gDNA zeigte sich schließlich als kleines Pellet, sodass der Überstand verworfen werden konnte. Um die gDNA zu reinigen wurden 600µl 70%igen unvergällten Ethanols hinzugegeben und das Reagiergefäß geschwenkt. Es folgte eine einminütige Zentrifugation, bevor das Ethanol entfernt werden konnte. Auf einer absorbierenden Oberfläche wurde das Reagiergefäß mit dem darin enthaltenen gDNA-Pellet 15 min getrocknet. Dann konnten 50µl „DNA Rehydration Solution“ hinzugegeben werden. Die Rehydrierung dauerte 60 min und erfolgte in einem Heizblock bei 65°C.

### 2.2.2 Schritt 2: Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der gDNA

Mit Hilfe des Photometers „Nanodrop 1000“ wurden sowohl Konzentration als auch Reinheit der in der Lösung enthaltenen gDNA bestimmt.

### 2.2.3 Schritt 3: RPS9 spezifische PCR und Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Proben wurde eine RPS9 spezifische PCR durchgeführt. Durch diese PCR sollte die Frage beantwortet werden, ob die DNA PCR-tauglich war. Das RPS9-Gen, das für das 40S ribosomale Protein S9 kodiert, wird als Haushaltsgen in allen Zellen exprimiert, und eignet sich daher gut zur Probenüberprüfung. Sollten die Proben DNA enthalten, so sollte sich diese DNA-Sequenz in der PCR amplifizieren lassen. Zur Visualisierung der Ergebnisse wurde im Anschluss eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

Die PCR (Polymerase Chain Reaction) dient der Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen. Am Anfang steht die Denaturierung. Damit die DNA sich in Einzelstränge auftrennt, wird zunächst mit einer hohen Temperatur gearbeitet - 94°C für 5 min. Es folgt die Bindung der PCR-Primer (annealing), wozu der Ansatz auf 60°C gekühlt wird. Bei den Primern handelt es sich um zwei einzelsträngige Oligonucleotid-Primer (Forward, Reverse), deren Sequenzen komplementär zu der DNA-Sequenz am 3'-Ende der DNA-Einzelstränge sind. Die nächste Phase nennt sich Polymerasereaktion. Für diese Phase braucht es die vier Desoxyribonucleosidtriphosphate dATP, dTTP, dCTP und dGTP, die die DNA-Polymerase – auch sie wird als Hauptakteur an dieser Stelle dringend benötigt- als Bausteine für die Synthese eines neuen DNA-Stranges benutzen kann. Diese Synthese findet bei 74°C statt. Für die Arbeit bei solchen Temperaturen braucht es ein thermostabiles Enzym, weshalb die verwendete Taq-Polymerase aus Bakterien gewonnen wird, die in heißen Quellen leben – Taq steht für *Thermus*

aquaticus. Dieser Reaktionszyklus wird nun mehrmals wiederholt, wodurch es zu einer exponentiellen Zunahme der DNA-Moleküle kommt (Heinrich et al. 2014). Im MOI-Labor werden bei der RPS9-PCR insgesamt 35 Zyklen im MyCycler™ Thermal Cycler durchlaufen. Die Cycling-Bedingungen im Überblick:

5 min	94°C	}	35 x
30 s	94°C		
30 s	60°C		
30 s	74°C		
5 min	74°C		

Bevor die Proben allerdings in den Cycler gegeben werden konnten, mussten sie für die PCR vorbereitet werden. Hierfür wurde nach einer Labor-SOP ein Mastermix (MM) erstellt. Dieser wurde für 7 Proben angesetzt und nach folgendem Schema pipettiert:

17,5 µl	PCR-Buffer (Complete, enthält MgCl <sub>2</sub> )
3,5 µl	dNTPs (10mM)
3,5 µl	Forward Primer
3,5 µl	Reverse Primer
1,4 µl	DSF-Taq-Polymerase
138,6 µl	Aqua dest.

Es wurde auf Eis gearbeitet und jeweils 24µl MM (ohne die Taq) in den Reagiergefäßen vorgelegt. Dann wurde 1µl Proben-DNA in das jeweilige Reagiergefäß gegeben. Ein Reagiergefäß enthielt als Negativkontrolle ausschließlich den MM, in einem anderen Reagiergefäß wurde als Positivkontrolle die DNA einer Probe verwendet, von der bekannt war, dass diese in der PCR funktionieren würde (HROC113cT0M1P6). Zum Schluss erfolgte die Zugabe der 0,2µl Taq. Jedes Reagiergefäß enthielt also ein finales Volumen von 25µl.

### **Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung und Visualisierung der in der RPS9-PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Mit diesem Verfahren können DNA-Fragmente einer Länge von 0,05 – 25kb getrennt werden, auch kann ihre Größe im Vergleich zu einem Größenmarker (DNA ladder) bestimmt werden. Zunächst zum Prinzip: Das Agarose-Gel hat Poren. Legt man eine Spannung an, so durchlaufen die wegen ihrer Phosphat-Moleküle negativ geladenen DNA-Moleküle das Gel in Richtung Pluspol. Die Fragmente mit einer kleineren Molekülmasse können schneller wandern, die Fragmente mit einer größeren Molekülmasse wandern langsamer. Mit einem Farbstoff werden die Banden, die man erhält, sichtbar gemacht.

Zur Herstellung des 1%igen Gels: 1,2g Agarose-Pulver wurden in einem Kolben zu 120ml TAE (Tris Acetat-EDTA)-Puffer gegeben und in der Mikrowelle bei maximaler Stärke so lange gekocht, bis der Feststoff vollständig gelöst war. Die Flüssigkeit wurde dann 5 min abgekühlt. Es folgte zu Färbungszwecken die Zugabe von 6µl Ethidiumbromid. Der Kolbeninhalt wurde dann ohne Luftblasen in einen Gelschlitten gegossen. Nach Einlegen eines 20er Kamms wurde 15 min abgewartet. In der Zwischenzeit konnten die DNA-Proben (je 25µl) anzentrifugiert und zu jeder Probe 5µl Probenpuffer (Loading dye) hinzugegeben werden. Es wurde auf Eis gearbeitet. Der im MOI-Labor hergestellte Probenpuffer wurde gebrauchsfertig zur Verfügung gestellt. Das Rezept für 50ml enthielt 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 50% Glycerin und 0,1M EDTA (pH8.0). Die Zugabe des Probenpuffers zu DNA-Proben erhöht deren Dichte und hilft, die Proben – sie haben sonst dieselbe Dichte wie der Elektrophorese-Puffer – leichter in die Geltaschen pipettieren zu können. Außerdem ist ein Farbstoff enthalten. Nach 15min konnte der Kamm aus dem Gel entfernt und der Gelschlitten in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer gegeben werden. Die Oberfläche des Gels sollte mit Flüssigkeit bedeckt sein. Es folgte das Befüllen der Geltaschen mit jeweils 12µl, wobei in die erste Tasche einzig 1µl des Größenmarkers (100bp DNA ladder) gegeben wurde, in die zweite Tasche in der Regel die Positivkontrolle, gefolgt von der Negativkontrolle in der dritten Tasche. Schließlich wurde die Kammer angeschlossen und lief 15 min unter einer Spannung von 80V, dann 45 min unter 100V. Nach Beendigung des Programms wurde das Gel unter UV-Licht mit der Intas Gel Kamera fotografiert und am PC mit Hilfe der Intas Capture Software ausgewertet und gespeichert (Mülhardt 2013; Heinrich et al. 2014).

### 2.2.4 Schritt 4: Multiplex - und Monoplex – PCR

Die Multiplex-PCR dient der Amplifizierung mehrerer DNA-Abschnitte in einer PCR-Reaktion. Hierfür wurde kein fertiges Kit verwendet. Alternativ wurden für die Multiplex-PCR zunächst vier Primerpaare (vWA, TH01, TPOX, CSF1PO) verwendet, mit FAM-Markierung am jeweiligen Forward-Primer. Der am Reverse-Primer ebenfalls mit FAM markierte Geschlechtsmarker AMEL wurde mit einer separaten Monoplex-PCR untersucht, einer Überschneidung der PCR-Produktgrößen wegen. Später wurden in Anlehnung an das PowerPlex 1.1 Kit der Firma Promega weitere vier Primerpaare hinzugenommen und jeweils am Forward-Primer mit HEX markiert (D5S818, D13S317, D7S820, D16S539). Diese vier Primer wurden in einer PCR zusammen mit AMEL verwendet.

Die Untersuchung jeder DNA-Probe bedeutete also immer zwei PCRs. Eine Ausnahme stellt die Anfangsphase dar, in der durch den Nachtrag der Analyse mit den vier HEX-markierten Primern insgesamt drei PCRs pro Probe durchgeführt wurden.

Die FAM-markierten Primer sowie die AMEL-Primer wurden von Dr. Christina Mullins (MOI-Labor) basierend auf Angaben der NIST STRBase (Stand: 2012) bei der Firma Metabion bestellt und standen einsatzbereit zur Verfügung. Es war auch Christina Mullins, die das Grundschema für den Mastermix und ein passendes Cycler-Programm erstellt hatte. Die HEX markierten Primer wurden mit Unterstützung durch Saskia Stier (MOI- Labor) von mir bestellt.

Praktisch wurde wie folgt vorgegangen: Die DNA-Proben für die Multiplex-PCR sollten eine Konzentration von 25ng/µl aufweisen. Für die Proben, die noch nicht die passende Konzentration aufwiesen, wurde die Verdünnung berechnet und anschließend mit destilliertem Wasser durchgeführt. In der PCR wurde ein Volumen von 1µl eingesetzt.

#### **Erstellung der Primer-Mixe**

Was die Primer angeht, so wurden drei Primer-Mixe (PM) erstellt: PM1 mit den Primerpaaren von vWA, TH01, TPOX und CSF1PO; PM2 mit dem Primerpaar von AMEL, und PM“neu“ mit den Primerpaaren von D5S818, D13S317, D7S820 und D16S539. In der Anfangsphase gab es lediglich PM1 und PM2, später wurde dann mit PM1 (in einer PCR-Reaktion) und einer Kombination aus PM2 und PM neu (in der zweiten PCR-Reaktion) gearbeitet.

Für die Primer von vWA, TH01, TPOX, CSF1PO und AMEL wurden vom MOI-Labor Working Stocks (Konz. 10 µM) zur Verfügung gestellt.

Nach folgendem Schema wurde für die Erstellung von PM1 und PM2 pipettiert:

<b>PM 1</b>	VWA	TH01	TPOX	CSF1PO
Forward	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
Reverse	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

<b>PM 2</b>	AMEL
Forward	25 µl
Reverse	25 µl

Da die besagten Working Stocks für die HEX-markierten Primer noch nicht vorlagen, wurden diese Primer (Konz. 100µM) für eine Konzentration von 10µM folgendermaßen verdünnt:

<b>PM neu</b>	5µl Primer	45µl dH <sub>2</sub> O	Reagiergefäß Nr:
D5S818	Forward x	x	1
	Reverse x	x	2
D7S820	Forward x	x	3
	Reverse x	x	4
D13S317	Forward x	x	5
	Reverse x	x	6
D16S539	Forward x	x	7
	Reverse x	x	8

Anschließend wurde der PM neu zusammengestellt, indem aus allen acht Reagiergefäßen jeweils 25µl gepoolt wurden. Es folgte die Zugabe von PM2.

### Mastermix (MM)1 und MM2

Im Anschluss wurden zwei Mastermixe erstellt: MM1 für die PCR mit den vier FAM-markierten Primern, MM2 für die PCR mit den vier HEX-markierten Primern und AMEL. Das Schema dazu sieht wie folgt aus, wobei die Taq als letzte Komponente beigefügt wurde:

Komponente	µl
RNAse freies Wasser	7,9
10x Complete Puffer	1,25
dNTP-Mix	0.25
Primer Mix	2
DSF-Taq	0,1

Es wurde grundsätzlich mit der DSF-Taq gearbeitet. Bei der initialen Testung der HEX-markierten Primer, oder als eine Multiplex-PCR einmal nicht zufriedenstellend funktioniert hatte, fand ausnahmsweise die MyTaq™ und der dazugehörige 5x Puffer Verwendung.

### Das weitere Procedere

Der MM wurde anzentrifugiert und in einer 96er-Platte vorgelegt, jeweils 11,5µl pro Well. Die DNA-Proben wurden ebenfalls anzentrifugiert und pipettiert: 1µl pro Well. Schließlich wurde die 96er-Platte in einem Heater mit Aluminiumfolie verschlossen, kurz zentrifugiert, und in den Cyclor gegeben. Das Programm lautete wie folgt:

2 min	96°C	
0,5 min	94°C	} 30x
2 min	59°C	
1,5 min	72°C	
45 min	60°C	
∞	4°C	

### 2.2.5 Schritt 5: Kapillarelektrophorese

Im Hinblick auf die Analyse in der Kapillarelektrophorese (3500 Analyzer, Applied Biosystems) wurde eine Verdünnung der PCR-Produkte vorgenommen. Es wurde hierfür mit einer Osprint® 96er-Platte auf Eis gearbeitet, das Zielvolumen jedes Wells betrug 20µl. Dementsprechend wurde in jedem Well 18µl destilliertes Wasser vorgelegt, dann 2µl des PCR-Produktes hinzugefügt. Es folgte die Herstellung eines MM aus BigDye® und dem Größenstandard ROX™: pro Probe jeweils 24µl BigDye® und 0,3µl ROX. Neben ROX wurde als Größenstandard alternativ auch LIZ™ eingesetzt. Aus dem MM wurde ein Volumen von 24,3µl pro Well in eine MicroAmp® Optical 96-Well-Platte pipettiert. Zuletzt wurde 1µl des verdünnten PCR-Produktes in die Wells pipettiert, nicht vollständig genutzte Reihen mit BigDye® aufgefüllt und die Platte mit Klebefolie verschlossen. Die Analyse mittels Kapillarelektrophorese wurde freundlicherweise von Dr. Björn Schneider im Institut für Pathologie der Universität Rostock durchgeführt.

### Prinzip der Kapillarelektrophorese

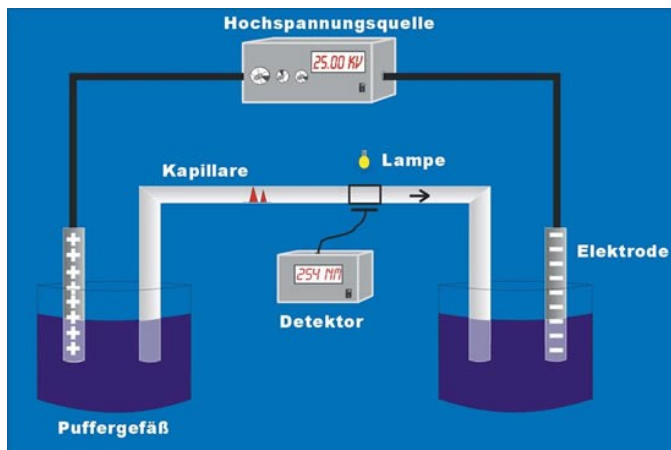


Abbildung 3: Prinzip der Kapillarelektrophorese (Wätzig 2014)

Die Kapillarelektrophorese, die zu den elektrophoretischen Trennverfahren gehört, macht es möglich, geladene Moleküle in einem elektrischen Feld ihrer Ladungszahl und Mobilität nach zu trennen (Wätzig 2014). Wird eine Spannung angelegt, so bewegen sich die negativ geladenen DNA-Fragmente nacheinander durch eine dünne Glaskapillare (Durchmesser 50-100µm), in der sich eine visköse Polymerlösung befindet. Abbildung 3 stellt das Prinzip einer



Kapillarelektrophorese dar, wobei DNA-Fragmente nicht in die mit dem Pfeil angezeigte Richtung, sondern in Richtung Pluspol (Anode) wandern. An einer Stelle in der Glaskapillare erfolgt die photometrische Detektion der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten DNA-Fragmente, wobei der Fluoreszenzfarbstoff durch einen Laser angeregt wird. Genauer erregt das von der Laserquelle kommende Photon ein Farbstoff-Elektron, das von seinem Grundzustand in einen angeregten Zustand - auf einem höheren energetischen Niveau - versetzt wird. Letztendlich fällt das Elektron aber wieder in seinen Grundzustand zurück und emittiert dabei spontan ein Photon, welches zwar eine niedrigere Energie hat als das Photon, das von der Laserquelle kam, wohl aber eine höhere Wellenlänge. So kann das System beide Photonen unterscheiden. Ferner erreicht jeder Fluoreszenzfarbstoff seine maximale Intensität bei einer anderen Wellenlänge (5-FAM 522nm, HEX 553nm ).Im Detektor befinden sich Filter, die jeweils nur Licht einer bestimmten Wellenlänge aufnehmen, also ein Filter für jedes Fluorophor (Butler 2001; Ender 2015). Noch einmal kurz zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente: Längere Fragmente wandern - wie auch schon bei der Agarose-Gelelektrophorese gesehen - langsamer, sodass kürzere Fragmente, die leichter durch die Polymerlösung gelangen, zuerst am Detektionsfenster ankommen. Das System misst die Zeit, die ein Fragment von der Injektion bis zur Laserdetektion benötigt.

### 2.2.6 Schritt 6: Arbeit mit der GeneMapper® – Software

Die Rohdaten eines jeden Laufs in der Kapillarelektrophorese wurden mir auf elektronischem Wege übermittelt. Es folgte das Einlesen der Dateien in den GeneMapper® (Version 4.1) und die Datenanalyse durch die Software, wobei das Programm Allele benannte, und zwar nach von mir eingangs eingepflegten Allelbezeichnungen.

Damit der GeneMapper® die Größe der Allele bestimmen konnte, musste für jede Probe eingegeben werden, welcher Größenstandard in der Elektrophorese mitgelaufen war. Auch wurde jede Probe im Programm beschriftet. Der GeneMapper® erstellte dann Elektropherogramme – im Idealfall mit vollständiger Allelbezeichnung. Normalerweise fand sich anstatt einer Allelbezeichnung aber nicht selten ein „?“, da das Programm für Produktgrößen außerhalb seiner Vorgaben keine Allelbezeichnung vergab. Ferner mussten die Elektropherogramme stets manuell so eingestellt werden, dass die Darstellung bestmöglich war. Stellten sich die Peaks für eine Probe z.B. besonders klein dar, so musste die Skalierung der y-Achse, auf der die relativen Fluoreszenzeinheiten zu finden sind, entsprechend angepasst werden. Nun ist eine Speicherung der Elektropherogramme in der Form

im GeneMapper® nicht möglich, weshalb zu Speicherzwecken PDFs erstellt wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die STR-Profile aller HROC-Proben anschließend in zwei Excel-Tabellen zusammengestellt, anhand derer die Auswertung der Daten erfolgte. Eine Tabelle enthält aus Gründen der Übersichtlichkeit lediglich die Genotypen, eine zweite Tabelle zusätzlich die Basenpaar-Angaben zu den jeweiligen Allelen. Für alle Nicht-HROC-Proben wurden separat ebenfalls zwei dieser Listen erstellt.

Als Beispiel findet sich das Elektropherogramm zu HROC126 für vier STR-Loci in Abbildung 11 (Anhang).

### **Welche Arbeitsschritte wurden für welche Probe durchgeführt?**

- Für 21+5= 26 Proben: Schritte 1-6
- Für 8 Proben: Schritte 2-6
- Für 31 Proben: Schritte 3-6
- 72 Proben bekam ich bereits in gDNA-Form, daher Schritte 4-6
- Zu 270 Proben bekam ich die Rohdaten von Anne Lehmann (MOI), wobei hierunter 12 Proben-Wiederholungen sind (Fälle, in denen die Elektropherogramme nicht auswertbar waren). Hier habe ich einzig Schritt 6 durchgeführt.

#### 2.2.6.1 DNA-Marker

Es wurde mit insgesamt neun DNA-Markern gearbeitet: vWA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539 (alle acht STR-Marker) und AMEL. AMEL steht für den Geschlechtsmarker Amelogenin, die übrigen Marker sind autosomal.

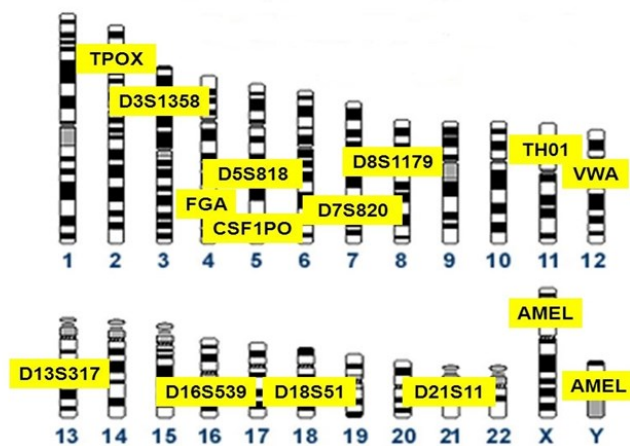


Abbildung 4: Lokalisation der DNA-Marker auf "ihren" Chromosomen (Butler 2001)

Bei den STR-Wiederholungseinheiten handelt es sich um Tetranukleotid-Wiederholungen. Diese Tetranukleotid-Wiederholungen kommen in bestimmten Bereichen der DNA vor, den sog. Loci, die im Fall der Kern-Loci, die zur Identitätsprüfung genutzt werden, nicht in einer kodierenden Region liegen (Butler 2006).

Es gibt insgesamt 13 wichtige STR-Loci, die 13 CODIS Kern-STR-Loci plus Amelogenin, und die oben genannten Marker entsprechen neun dieser Loci. CODIS steht für Combined DNA Index System, gemeint ist aber weit mehr als nur ein System, in dem einige Marker bestimmt wurden. Es handelt sich vielmehr um ein Projekt, das 1990 vom amerikanischen FBI begonnen wurde (Butler 2001). Es gibt eine Software zum Abgleich von STR-Profilen, die CODIS heißt, und in den Vereinigten Staaten ein ganzes auf der regionalen bis hin zur staatlichen Ebene organisiertes System zum Abgleich von DNA-Profilen, in dem mit der CODIS Software gearbeitet wird. Jedenfalls arbeitet man inzwischen weltweit mit den 13 CODIS Loci und den dortigen Allelen. Bei der Zusammenstellung der STR-Marker diente das PowerPlex 1.1 Kit der Firma Promega als Orientierung, d. h. die Marker sind auch in dem besagten Kit enthalten. Es wurde aber eben kein fertiges STR-Kit verwendet. In diesem Zusammenhang benutzt Margaret Kline in einem Vortrag den Ausdruck „homebrew method“ (Kline 2009). Und obwohl sie wahrscheinlich eher eine vollkommen eigene Markerzusammenstellung meint, so trifft dieser Ausdruck doch auch in gewisser Weise auf das hiesige Vorgehen zu.

Um noch einmal auf die Allele zurück zu kommen. Sie werden nach der Anzahl der Wiederholungseinheiten benannt, wobei zwei der hier verwendeten Marker, nämlich TH01 und D7S820, inkomplette Wiederholungssequenzen enthalten, die Punktalles genannt werden. Ein solches typisches Punktalles im STR-System TH01 ist das Allel 9.3, das aus neun vollständigen Tetranukleotidwiederholungen besteht, und einer inkompletten Wiederholung von nur drei anstatt vier Nukleotiden. Man sieht, dass der inkomplette Teil der Wiederholungssequenz hinter dem Punkt angegeben wird.

Ich habe nach den Vorgaben einer STR „Standard Reference Database“ auf den Internetseiten des amerikanischen National Institute of Standards and Technology, kurz NIST, basierend auf PCR-Produktlängen in Basenpaaren Allelbezeichnungen in mein Projekt im GeneMapper® eingepflegt (Ruitberg et al. 2001). Eine Kopie dieser Listen, wie sie zum Zeitpunkt der Arbeit mit dem GeneMapper® aktuell waren, findet sich im Anhang dieser Arbeit, eine aktuelle Version unter: <http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/kits/PowerPlex1.1.htm>. Es ist in der Zwischenzeit allerdings nicht zu umfangreichen Aktualisierungen gekommen, ein Aspekt, der im Diskussionsteil dieser Arbeit noch einmal aufgegriffen wird. Ferner wird in der Diskussion das Thema Punktalles noch einmal aufgegriffen, und die Tatsache, dass ich dem GeneMapper® diese Punktalles fast ebenso zahlreich „beigebracht“ habe wie die Konsensus-Allele (Siehe Kritik Teil 1).

Bezüglich der Fälle, in denen der GeneMapper® keine Allelbezeichnung vornehmen konnte: hier wurden entweder die „?“ in die Excel-Liste übernommen - die zweite Liste enthält ja die Basenpaare, anhand derer auch eine Analyse durchgeführt werden kann, oder es wurden die Basenpaare anstatt der Allelbezeichnungen festgehalten. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde die Allelbenennung dann für die größeren Probenblöcke manuell vorgenommen, wobei wie folgt vorgegangen wurde: Nach Crouse et al. wurden Allele zwischen Konsensusallelen nach dem nächstkleineren Konsensusallel benannt und dann mit einem „x“ gekennzeichnet, z.B. Allel 10.x. (Crouse et al. 1999).

### **Der Geschlechtsmarker Amelogenin**

Es ist zunächst wichtig zu erwähnen, dass AMEL kein STR ist (Dirks et al. 2005). Es ist ein Geschlechtsmarker. Das AMEL genannte Amelogenin-Gen – es kodiert für Zahnschmelz-Proteine – kommt sowohl auf dem X-Chromosom (AMELX) als auch homolog auf dem Y-

Chromosom (AMELY) vor. Man kann mit ein und demselben Primerpaar die besagten Allele in einer PCR-Reaktion amplifizieren, da die Primer so entwickelt wurden, dass sie an sich auf dem X- und Y-Chromosom entsprechenden flankierenden Regionen binden (Mitchell et al. 2006). Sullivan et al. hatten das erstmalig in 1993 beschrieben, und auch die Tatsache, dass man trotzdem unterschiedlich große Amplikons erhält, was an einer 6bp großen Deletion im Intron 1 auf dem Amelogenin-Gen des X-Chromosoms liegt (Butler 2001). Wenn man mit dem PowerPlex 1.1. Kit der Firma Promega arbeitet, an dem ich mich orientiert habe, dann erhält man der Literatur nach für Y ein 218bp großes Amplikon, für X wie beschrieben das 6bp kleinere 212bp-Amplikon. Die Größe meines PCR-Produktes beträgt für Y 216,7bp und für X 210,4bp. Auf den Elektropherogrammen sieht man einen Peak, wenn die Probe von einem weiblichen Individuum stammt, zwei Peaks wenn sie von einem männlichen Individuum stammt. Nun gibt es seltene Fälle von männlichen Individuen, die sog. AMELY nulls, bei denen die Geschlechtsbestimmung nur ein X-Amplikon liefert. Im mittleren Bereich des nun folgenden Kapitels „Ergebnisse“ werden AMELY nulls und mögliche Ursachen noch einmal aufgegriffen, da dieses Thema auch für die HRO-Tumormodelle relevant ist.

## 3 Ergebnisse

Die Daten, auf denen dieses Kapitel basiert, stammen hauptsächlich aus der Excel-Tabelle mit den Ergebnissen für 350 bearbeitete HROC-Proben. Sie stellen den Schwerpunkt der Analyse dar. Gegen Ende des Kapitels wird das Ergebnis der Untersuchung weiterer diverser Probenblöcke vorgestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Angabe der Länge der PCR-Produkte in bp verzichtet. Die Tabellen, die im Folgenden gezeigt werden, sind exemplarische Auszüge und wurden mehrmals überarbeitet. In den entsprechenden Elektropherogrammen sind Peaks nicht immer mit einer Allelbezeichnung versehen. Das Vorgehen im Fall eines „?“- Allels wurde bereits im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben. Auch fällt beim Betrachten der Tabellen auf, dass sich dort viele Punkttallele finden. Im Kapitel „Diskussion“ wird diese Tatsache näher besprochen werden. Die Tabellen sind so aufgebaut, dass sich die FAM-gelabelten Marker, deren Peaks in den Elektropherogrammen blau aussehen, in den Spalten im oberen Bereich befinden. Die Spalten des unteren Bereichs zeigen die HEX-gelabelten Marker, die in den Elektropherogrammen grün dargestellt sind. In den Zeilen stehen die untersuchten Proben. Sie wurden in folgender Reihenfolge angeordnet: Normalgewebe (N), B-Zellen aus dem Patientenblut (Bc), Tumor

infiltrierende B-Zellen (TiBc), Originaltumor (T), Tumorzelllinie, PDX, PDX-abgeleitete Zelllinie. „Met“ steht für Metastase. Ist ein Locus homozygot, so wurde – ähnlich der Darstellung im Elektropherogramm, in dem dann nur ein Peak zu sehen ist - das entsprechende Allel tatsächlich nur „einmalig“ aufgeführt. Wenn in der Tabelle z.B. für den Marker vWA Allel 15 steht, so ist der Genotyp 15,15 gemeint. In Anlehnung an das engl. „off-ladder“ wurde die Abkürzung „o-l“ für ein Allel gebraucht, das im Bereich zwischen zwei Markern liegt.

### 3.1 Non-MSI

Als Einstieg wurde für Tabelle 1 der Datenblock HROC18 ausgewählt. Einmal, weil hier die DNA-Profile aller untersuchten Proben übereinstimmen, was bei den HROCs insgesamt selten der Fall ist. Mit den Gründen hierfür wird sich das Kapitel „Diskussion“ beschäftigen. HROC18 wurde ferner ausgewählt, weil die Tumorzelllinie als eine von insgesamt vier der in dieser Arbeit untersuchten Tumorzelllinien zur externen Kontrolle an die DSMZ geschickt wurde. Auch dazu mehr im Diskussionsteil.

Jedenfalls sieht man bei HROC18 keinen Unterschied zwischen Normalgewebe und B-Zellen, und auch das STR-Profil des Tumors entspricht dem des Normalgewebes. Die Tumorzelllinien zeigen ebenfalls keine Abweichungen, unabhängig von der Passage. Was den Geschlechtsmarker Amelogenin angeht, so bedeutet „f“, „female“, dass sich für jede Probe der Genotyp X,X fand. In dem untersuchten Probengut gab es kein PDX-Material zu HROC18.

**Tabelle 1: HROC18**

Sample Name	VWA		TH01		TPOX		CSF1PO		AMEL
HROC18(N)	17		7.1	8	7.3		12		f
BcHROC18	17		7.1	8	7.3		12		f
HROC18(T)	17		7.1	8	7.3		12		f
HROC18 P13	17		7.1	8	7.3		12		f
HROC18 P37	17		7.1	8	7.3		12		f

Sample Name	D5S818		D13S317		D7S820		D16S539	
HROC18(N)	8	10.1	14		8	11	11	12.1
BcHROC18	8	10.1	14		8	11	11	12.1
HROC18(T)	8	10.1	14		8	11	11	12.1
HROC18 P13	8	10.1	14		8	11	11	12.1
HROC18 P37	8	10.1	14		8	11	11	12.1

Der nächste Datenblock HROC40 (Tabelle 2) enthält auch die Daten des PDX (HROC40 T1 M1).

**Tabelle 2: HROC40**

Sample Name	VWA		TH01		TPOX		CSF1PO		AMEL
HROC40(N)	15	17	8	9.1	7.3		10		m
BcHROC40	15	17	8	9.1	7.3		10		m
HROC40(T)	15	17	8	9.1	7.3	11	10		f
HROC40 P27	15	17	8		7.3		10		f
HROC40 T1 M1	15	17	8	9.1	7.3		10		f

Sample Name	D5S818		D13S317		D7S820		D16S539	
HROC40(N)	10.1	12.3	14	15	10.3		10	
BcHROC40	10.1	12.3	14	15	10.3		10	
HROC40(T)	10.1	12.3	14		11		10	
HROC40 P27	10.1	12.3	14	15	10.3		10	
HROC40 T1 M1	10.1	12.3		15	10.3		10	

Auch hier findet sich kein Unterschied in den STR-Profilen von Normalgewebe und B-Zellen. Das Tumorgewebe weicht bei den Markern TPOX und D13S317 ab. Während N und Bc bei TPOX homozygot sind, zeigt das Tumorgewebe einen heterozygoten Genotyp. Bei D13S317 ist es umgekehrt. Im STR-System TH01 ist die Tumorzelllinie im Unterschied zum Originaltumor homozygot. PDX ist für D13S317 wieder homozygot. Das Phänomen des Wegfallens eines Allels nennt sich Verlust der Heterozygotizität (LOH, für „loss of heterozygosity“). Was man der Tabelle so nicht entnehmen kann, wohl aber dem hier nicht aufgeführten Elektropherogramm, ist dass der Tumor bei D13S317 eine sog. Peak-Höhen Imbalance aufweist, die Peaks also einen verhältnismäßig großen Höhenunterschied haben. HROC40 P27 zeigt beim Marker TH01 ebenfalls ein solches Bild. Was Amelogenin angeht, so

weisen die HROC40 Proben interessanterweise anders als HROC18 keinen einheitlichen Genotyp auf. Die Untersuchung des Normalgewebes und der B-Zellen ergab X,Y, also „m“, „male“, während das Tumorgewebe, die Tumorzelllinie und PDX einen X,X-Genotyp ergaben.

**Tabelle 3: HROC43**

Sample Name	VWA			TH01		TPOX		CSF1PO		AMEL
HROC43(N)	15		17	10		10.3		9	11	m
BcHROC43 P18	15		17	10		10.3		9	11	m
HROC43(T)	15		17	10		10.3		9	11	m
HROC43 P30	14	15	17	10		10.3			11	f

Sample Name	D5S818			D13S317		D7S820		D16S539	
HROC43(N)	11.1	12.3		11	15	9	13	8	12.1
BcHROC43 P18	11.1	12.3		11	15	9	13	8	12.1
HROC43(T)	11.1	12.3		11	15	9	13	8	12.1
HROC43 P30	11.1			11			13	8	12.1

Bei HROC43 (Tabelle 3) findet sich für N, Bc und T kein Unterschied in den STR-Profilen. Das Profil von HROC43 P30 weicht schließlich an mehreren Stellen ab. So zeigt sich beim Marker vWA der Zugewinn eines Allels, nämlich des Allels 14, sodass an diesem Locus insgesamt drei Allele vorliegen. Wo alle übrigen HROC43 Proben für CSF1PO einen heterozygoten Genotyp aufweisen, ist der Genotyp der Tumorzelllinie mit 11,11 homozygot. Abb. 13 im Anhang zeigt die zugehörigen Elektropherogramme als Beispiel für das Auftauchen neuer Allele und das Phänomen LOH. CSF1PO ist aber nicht der einzige Marker, bei dem es im Bereich der Tumorzelllinie zu LOH kommt. D5S818, D13S317 und D7S820 weisen auch diese Veränderung auf. Und schließlich „tanzt“ die Tumorzelllinie auch als einzige beim Geschlechtsmarker „aus der Reihe“, da hier das Y-Chromosom verloren geht.

**Tabelle 4: HROC60**

Sample Name	VWA		TH01		TPOX		CSF1PO		AMEL
BcHROC60	15	17	6.1	8	10.3		10	11	m
TiBcHROC60	15	17	6.1	8	10.3		10	11	m
HROC60(T)	15	17	6.1	8	10.3		10	11	m
HROC60 P7		17	6.1	8	10.3			11	m
HROC60 P32		17	6.1	8	10.3			11	m
HROC60f T1 M2		17	6.1	8	10.3			11	m



Sample Name	D5S818		D13S317		D7S820		D16S539	
BcHROC60	11.1	12.3	11	14	10	12	8	10
TiBcHROC60	11.1	12.3	11	14	10	12	8	10
HROC60(T)	11.1	12.3	11	14	10	12	8	10
HROC60 P7	11.1		11	14	10	12	8	10
HROC60 P32	11.1		11	14	10	12	8	10
HROC60f T1 M2	11.1		11	14	10	12	8	10

Zu HROC60 (Tabelle 4) kann leider kein DNA-Profil des Normalgewebes gezeigt werden, wohl aber das Profil Tumor infiltrierender B-Zellen, deren Betrachtung sich stattdessen anbietet, gelten diese Zellen doch auch als “normal“. Man sieht, dass wie schon bei dem vorherigen Probenblock kein Unterschied zwischen den Ergebnissen für TiBc, Bc und T besteht. Das Profil der Tumorzelllinie zeigt Abweichungen und stimmt mit dem Profil des PDX überein. Ferner zeigt sich kein Unterschied in den Passagen der Tumorzelllinie. Beim Profil der Letzteren zeigt sich neu LOH bei den Markern vWA, CSF1PO und D5S818. Am Rande sei noch erwähnt, dass man im Elektropherogramm von P7 und P32 im Bereich des Markers TH01 neu eine ausgeprägte Peak-Höhen Imbalance sieht. Berechnet man eine Ratio (Berechnung Siehe Diskussion), um den Locus auf LOH zu prüfen, dann ergibt sich LOH beim Vergleich der Tumorzelllinie mit Bc, allerdings kein LOH beim Vergleich der Tumorzelllinie mit T. Die Peakgrößen liegen genau an der Grenze, was die Bewertung des Falls erschwert. Im Zweifelsfall wurde der Locus hier heterozygot aufgeführt. Der Genotyp für Amelogenin lautet überall einheitlich X,Y.

**Tabelle 5: HROC57**

Sample Name	VWA		TH01		TPOX		CSF1PO		AMEL
BcHROC57	14	17	6.1	9.1	7.3	10.3	10	14	m
TiBcHROC57	14	17	6.1	9.1	7.3	10.3	10	14	m
HROC57 P25	14	17	6.1		7.3		9.3		f

Sample Name	D5S818		D13S317		D7S820		D16S539	
BcHROC57	10.1	11.1	15		10	11	8	11
TiBcHROC57	10.1	11.1	15		10	11	8	11
HROC57 P25		11.x	15			11	8	11

Zu HROC57 (Tabelle 5) gibt es erneut kein N, aber wieder TiBc. Wie bei den bisherigen Probenblöcken entspricht das DNA-Profil der Letztgenannten dem Profil der B-Zellen aus dem Patientenblut. LOH lässt sich bei der Tumorzelllinie gleich im Bereich von fünf Markern finden, nämlich bei TH01, TPOX, CSF1O, D5S818 und D7S820. Die Tumorzelllinie hat beim Marker Amelogenin den Genotyp X,X, Bc und TiBc hingegen den Genotyp X,Y.

**Tabelle 6: HROC103**

Sample Name	VWA		TH01		TPOX		CSF1PO		AMEL
HROC103N	14	15	6.1	9.1	7.3		12		m
BcHROC103 P9	14	15	6.1	9.1	7.3		12		m
TiBc103 P4	14	15	6.1	9.1	7.3		12		m
HROC103Tu	14	15	6.1	9.1	7.3		12		m
"Xeno103"= HROC103 T0 M1	14	15	6.1	9.1	7.3		12		f
HROC103 T0 M1 P36	14	15	6.1	9.1	7.3		12		f

Sample Name	D5S818		D13S317		D7S820		D16S539	
HROC103N	11.x	12.3	14	16	8	10	11	12.1
BcHROC103 P9	11.1	12.3	14	16	8	10	11	12.1
TiBc103 P4	11.1	12.3	14	16	8	10	11	12.1
HROC103Tu		12.3	14	16	9	10	11	12.1
"Xeno103"= HROC103 T0 M1		12.3	14	16	9	10	11	12.1
HROC103 T0 M1 P36		12.3		16	9	10	11	12.1

Auch bei HROC103 (Tabelle 6) sind die STR-Profile von N, TiBc und Bc identisch. Das Profil von T weicht im Bereich des Markers D5S818 und D7S820 ab, wo sich anstatt D5-11.x und D5-12.3 schließlich einzig D5-12.3, und anstatt D7-8 und D7-10 die Allele 9 und 10 zeigen. Auch weist T bei vWA und TH01 neu eine Peak-Höhen Imbalance auf, die bei der PDX-abgeleiteten Zelllinie noch deutlicher ausgeprägt ist. Das PDX-Material zeigt im Vergleich zum Normalgewebe Veränderungen im Bereich von zwei Markern: anstatt der Allele 8 und 10 kommen bei D7S820 wie beim Original-Tumormaterial die Allele 9 und 10 vor, bei D5S818 findet sich LOH, Allel 11.x fällt weg. Das Profil der PDX-abgeleiteten Zelllinie entspricht bis auf D13S317 dem PDX-Profil. Schließlich hat das Nicht-PDX-Material beim Geschlechtsmarker Amelogenin den Genotyp X,Y, während das PDX-Material einen X,X-Genotyp aufweist.

**Tabelle 7: HROC80**

Sample Name	VWA		TH01		TPOX		CSF1PO		AMEL
HROC80N	17	16	6.1	8	7.3	10.3	12		m
HROC80Tu	17	16	6.1	8	7.3	10.3	12		m
HROC80 T1 M1	17		6.1		7.3	10.3	12		m
HROC80 T1 M1 P28	17		6.1		7.3	10.3	12		f

Sample Name	D5S818		D13S317		D7S820		D16S539	
HROC80N	11.x	12.3	11	13	9	11	9	10
HROC80Tu	11.x	12.3	11	13	9	11	9	10
HROC80 T1 M1	11.x	12.3	11		9	11	9	
HROC80 T1 M1 P28	11.1	12.3	11		9	11	9	

Tabelle 7 zeigt HROC80 betreffend identische STR-Profile für Normal- und Tumorgewebe. Unterschiede zwischen dem Originaltumor und PDX finden sich bei den Markern vWA, TH01, D13S317 und D16S539, wo sich das Phänomen LOH zeigt. Das PDX-Material ist in diesen STR-Systemen also homozygot. Das DNA-Profil der PDX-abgeleiteten Zelllinie entspricht mit Ausnahme des gonosomalen Markers dem Profil des PDX.

**Tabelle 8: HROC39**

Sample Name	VWA		TH01		TPOX		CSF1PO		AMEL
HROC39(N)	16	18	7.1	10	7.3	10.3	12		m
BcHROC39	16	18	7.1	10	7.3	10.3	12		m
HROC39(T)	16	18	7.1	10	7.3	10.3	12		m
HROC39 P23	16	18	7.1	10	7.3	10.3	12	13	f
XenoHROC39 T2 M1	16	18	7.1	10	7.3	10.3	12	13	f
HROC39 T0 M2 P26	16	18	7.1	10	7.3	10.3	12	13	f

Sample Name	D5S818		D13S317		D7S820		D16S539	
HROC39(N)	10.1	12.3	15	16	12		8.x	11
BcHROC39	10.1	12.3	15	16	12		8.x	11
HROC39(T)		12.3	15	16	12			11
HROC39 P23		12.3	15	16	12			11
XenoHROC39 T2 M1		12.3	15	16	12			11
HROC39 T0 M2 P26		12.3		16	12			11

Die STR-Profile von N und Bc entsprechen sich auch bei HROC39 (Tabelle 8). Mit diesen Profilen stimmt das STR-Profil des Tumormaterials bis auf D5S818 und D16S539 (in beiden Fällen LOH) überein, wenngleich T neu bei vWA eine Peak-Höhen Imbalance aufweist. Zu Veränderungen kommt es bei der Tumorzelllinie, bei der sich im Bereich von CSF1PO neu Allel 13 findet, sodass der Genotyp an diesem Locus nun heterozygot ist. Dieses Allel kommt bei den PDX-Proben für CSF1PO ebenfalls vor. N, Bc und T haben beim Geschlechtsmarker Amelogenin den Genotyp X,Y, Tumorzelllinie und PDX-Proben hingegen X,X.

**Tabelle 9: HROC107**

Sample Name	VWA			TH01		TPOX		CSF1PO		AMEL
HROC107(N)	16	17		8	9.1	10	10.3	10	12	m
TiBcHROC107# 5 P33	16	17		8	9.1	10	10.3	10	12	m
HROC107(T)	16	17		8	9.1	10	10.3	10	12	m
HROC107 ft0 M1	16	17		8	9.1	10	10.3	10	12	m
HROC107 T0 M2 P38	16				9.1	10	10.3	10		m

Sample Name	D5S818			D13S317		D7S820		D16S539	
HROC107(N)	10.1	12.3		11	15	10	11	9	11
TiBcHROC107# 5 P33	10.1	13	14	11	15	10	11	9	11
HROC107(T)	10.1	12.3		11	15	10	11	9	11
HROC107 ft0 M1	10.1	12.3		11	16	10	11	9	11
HROC107 T0 M2 P38		12.3		11	16	10	11	9	11

Bei HROC107 (Tabelle 9) stellt sich die Frage, wie es sein kann, dass das STR-Profil der TiBc nicht mit dem STR-Profil des Normalgewebes übereinstimmt, und woher das zusätzliche dritte Allel im STR-System D5S818 kommt. Ferner zeigt sich bei D13S317 ein Unterschied zwischen Tumor und PDX. Es kommt zum Shift von Allel 15 beim Tumor zu Allel 16 beim PDX. Die PDX-abgeleitete Zelllinie unterscheidet sich gleich in vier STR-Systemen vom PDX, da Allele wegfallen.

**Tabelle 10: HROC147**

Sample Name	VWA			TH01		TPOX		CSF1PO				AMEL
HROC147(N)	17	19	o-l	8	10	7.3	10.3	11	12			m
HROC147(T)		19		8	10	7.3	10.3	11	12	13	14	m
HROC147 T1 M1		19		8	10	7.3	10.3			13	14	m
HROC147 T0 M1 P10		19		8	10	7.3	10.3			13	14	m

Sample Name	D5S818			D13S317		D7S820		D16S539	
HROC147(N)	10.1	12.3		12	14	9		9	10
HROC147(T)	10.1			12		9		9	10
HROC147 T1 M1	10.1			12		9		9	10
HROC147 T0 M1 P10	10.1			12		9		9	10

Im Vergleich zu N findet sich beim HROC147 Tumormaterial (Tabelle 10) in den STR-Systemen vWA, D5S818 und D13S317 das Phänomen LOH. Im STR-System CSF1PO weist das Tumormaterial gleich vier Allele auf, hier findet sich ein offensichtliches Beispiel für die Kontamination eines Tumors durch Normalgewebe, sieht man die beiden Allele CSF1PO-11 und CSF1PO-12 doch auch bei N. Unterschiede zwischen Tumor und PDX finden sich außer bei CSF1PO auch bei D5S818 und D13S317, diese Unterschiede sind allerdings nur in den Elektropherogrammen zu erkennen. Für beide Loci wurde über LOH beim Tumor im Vergleich zu N anhand von Ratios entschieden, im Elektropherogramm von T aber zeigen sich noch zwei Peaks. Die STR-Profile von PDX und PDX-abgeleiteter Zelllinie stimmen überein.

**Tabelle 11: HROC173**

Sample Name	VWA		TH01		TPOX		CSF1PO		AMEL
HROC173(N)	17	19	7.1		7.3	10	11	12	m
TiBcHROC173 #3 P7	17	19	7.1		7.3	10	11	12	m
TiBcHROC173 #4 P5	17	19	7.1		7.3	10	11	12	m
TiBcHROC173 #8 P4	17	19	7.1		7.3	10	11	12	m
HROC173(T)		19	7.1		7.3	10	11	12	m
HROC173 P12		19	7.1		7.3	10	11	12	f
HROC173 T2 M1		19	7.1		7.3	10	11	12	f

Sample Name	D5S818		D13S317		D7S820		D16S539	
HROC173(N)	11.x		14	15	10		11	
TiBcHROC173 #3 P7	11.x		14	15	10		11	
TiBcHROC173 #4 P5	11.x		14	15	10		11	
TiBcHROC173 #8 P4	11.x		14	15	10		11	
HROC173(T)	11.x		14		10		11	
HROC173 P12	11.1		14		10		11	
HROC173 T2 M1	11.x		14		10		11	

Bei HROC173 (Tabelle 11) gibt es drei unterschiedliche TiBc-Klone, deren STR-Profile mit dem des Normalgewebes übereinstimmen. Was die FAM-gelabelten Marker angeht, so zeigt T

bei vWA neu LOH, Allel 17 ist im Elektropherogramm deutlich kleiner als bei N. Zu den HEX-gelabelten Markern: Im STR-System D13S317 zeigt das Tumormaterial LOH, im Elektropherogramm sieht man eine deutliche Peak-Höhen Imbalance (Allel 15 ist kleiner als Allel 14). Diese ausgeprägte Imbalance zeigt sich dann auch bei Tumorzelllinie und PDX, wobei der Peak zu Allel 15 im Elektropherogramm nicht vollständig verschwindet. Die Profile von Tumorzelllinie und PDX stimmen überein. Den Geschlechtsmarker Amelogenin betreffend fällt ein sich auf dem Niveau der Tumorzelllinie ändernder Genotyp auf.

### Probenblöcke, die Proben von Metastasen enthalten

**Tabelle 12: HROC112**

Sample Name	VWA			TH01		TPOX		CSF1PO		AMEL
HROC112(N)	14	18	o-l	7.1		7.3		9.3	12	f
HROC112(T)	14	18	o-l	7.1		7.3		10	12	f
HROC112Met	14	18		7.1		7.3		9.3	12	f

Sample Name	D5S818			D13S317		D7S820		D16S539	
HROC112(N)	10.1			14	15	8	12	8	9
HROC112(T)	10.1			14		8	12	8	9
HROC112Met	10.1			14		8	12	8	

Das STR-Profil des Tumormaterials unterscheidet sich bei HROC112 (Tabelle 12) vom STR-Profil des Normalgewebes, und zwar bei CSF1PO - wobei dieser Unterschied minimal ist – und bei D13S317, wo T den Genotyp 14,14 zeigt anstatt wie N 14,15 (LOH). Das STR-Profil der Metastase unterscheidet sich von dem des Tumors: Es gibt einen minimalen Unterschied bei CSF1PO, aber vor allem findet sich ein Unterschied bei D16S539. Hier ist T heterozygot, wohingegen die Metastase einen homozygoten Genotyp aufweist (LOH).

**Tabelle 13: HROC130**

Sample Name	VWA			TH01		TPOX		CSF1PO		AMEL
HROC130(N)	16	19		8	10	7.3		8.3	14	m
HROC130(T)	16	19	o-l	8	10	7.3		8.3	14	m
HROC130Met	16	19		8	10	7.3		8.3	14	m
HROC130 T2 M2	16	19		8	10	7.3		8.3	14	m

Sample Name	D5S818			D13S317		D7S820		D16S539	
HROC130(N)	12.3			14	15	9		10	
HROC130(T)	12.3			14	15	9		10	
HROC130Met	12.3			14	15	9		10	
HROC130 T2 M2	12.3				15	9		10	

Mit Ausnahme eines Off-Ladder Allels- im Elektropherogramm zwischen vWA und TH01- und LOH beim PDX im STR-System D13S317 finden sich bei HROC130 (Tabelle 13) keine Unterschiede in den STR-Profilen: N = T = Met. In den Elektropherogrammen sieht man, dass D13S317-14 bei der Metastase bereits deutlich kleiner ist als bei N oder T, im Profil des PDX ist dieses Allel dann so klein, dass es nicht mehr als relevant angesehen werden kann.

**Tabelle 14: HROC72**

Sample Name	VWA		TH01		TPOX		CSF1PO		AMEL
HROC72(T)	14	18	3.1	6.1	10	10.3	11	12	m
HROC72Met	14	18	3.1	6.1	10	10.3	11	12	m

Sample Name	D5S818		D13S317		D7S820		D16S539	
HROC72(T)	10.1	12.3	14	15	10	12	11	
HROC72Met	10.1	12.3	14	15	10	12	11	

Auch bei HROC72 (Tabelle 14) findet sich kein Unterschied zwischen den STR-Profilen von Tumor und Metastase. Es gibt noch einen weiteren Probenblock, der das STR-Profil einer Metastase enthält, und zwar HROC224 (Tabelle 24, Anhang). Das STR-Profil der Metastase unterscheidet sich von dem des Tumorgewebes bei D7S820, wo die Metastase anders als der Tumor einen homozygoten Genotyp aufweist. Bei CSF1PO zeigt die Metastase den heterozygoten Genotyp des Normalgewebes, während der Tumor homozygot ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den vier Probenblöcken, die sowohl Informationen zum Tumorgewebe als auch zu den jeweiligen Metastasen enthalten, die STR-Profile von Tumor und Metastase nicht immer identisch sind. Wenn man einmal von den Off-Ladder Allelen absieht, dann entspricht das STR-Profil der Metastase bei HROC130 und HROC72 dem des jeweiligen Tumorgewebes. Bei HROC112 und HROC224 hingegen finden sich Fälle von LOH bei der Metastase. Bei HROC224 weist die Metastase an einem Locus den Genotyp des

Normalgewebes auf, von dem sich der Genotyp des Tumors unterscheidet. Man muss allerdings dazu sagen, dass die Intensität der Peaks im HROC224 Tumor-Elektropherogramm geringer ist als bei Normalgewebe und Metastase. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass CSF1PO-10 bei einer Reanalyse größer ausfallen würde, womit sich die Unterschiede zwischen Tumor und Metastase auf Fälle von LOH beschränken würden. Für die von mir untersuchten Fälle gilt: Die STR-Profile von Tumor und Metastase können übereinstimmen, sie müssen es aber offensichtlich nicht.

### 3.2 MSI

**Tabelle 15: HROC24 MSI**

Sample Name	VWA			TH01			TPOX		CSF1PO		AMEL
HROC24(N)	16	18		6.1	9.1		10.3		10	11	m
BcHROC24 P25	16	18		6.1	9.1		10.3		10	11	m
HROC24(T)											m
HROC24 P25	16	21		6.1	9.1		10.3		10	11	m
HROC24 ft2 M4	16	21		6.1	9.1		10.3		10.3	12	m
HROC24 T1 M1 P22	16	20		6.1	9.1		10.3		11	12	m

Sample Name	D5S818			D13S317			D7S820			D16S539	
HROC24(N)		12			11	16	10	14		8.x	10
BcHROC24		12			11	16	10	14		8	10
HROC24(T)	9.x	11.x	10	10	11	16		13		8	10
HROC24 P25	10	12		10		16	11	13		8	10
HROC24 ft2 M4	9	10.1		10		17	11	13		9	10
HROC24 T1 M1 P22	9	10.1		10	11	16	11	13		8	10

In Tabelle 15 finden sich – wie auch in den folgenden Tabellen - STR-Profile von Mikrosatelliten instabilen Proben (MSI). Wie auch schon bei den vorherigen Probenblöcken stimmen die Profile von N und Bc überein. Ein Teil der Zeile bei HROC24(T) ist nicht ausgefüllt, da kein verwertbares Elektropherogramm existiert. So lässt sich leider nur teilweise eine Aussage zum Originaltumor machen. Dieser weist z.B. im STR-System D5S818 drei Allele auf, nämlich Allel 9.x, 11.x und 10. Das letztgenannte Allel findet sich auch bei der Tumorzelllinie. Deren Profil stimmt in weiten Teilen mit dem der B-Zellen überein, unterscheidet sich aber vom Profil des Tumormaterials in drei von vier untersuchten HEX-



markierten STR-Systemen (D5S818, D13S317, D7S820). In den STR-Systemen TH01 und TPOX stimmen alle HROC24-Proben überein, in vWA und D16S539 zu großen Teilen. Die Abweichungen bei den beiden letztgenannten Markern betreffen lediglich eines der beiden Allele, während das zweite Allel sich unverändert in jeder Probe findet. Es gibt bei HROC24 keine Veränderungen beim Geschlechtsmarker Amelogenin.

**Tabelle 16: HROC87 MSI**

Sample Name	VWA					TH01			TPOX		CSF1PO		AMEL
HROC87(N)	16		18		0-l	8			10.x		12		f
BcHROC87 P11	16		18			8			10.3		12		f
HROC87(T)	16		18	20	0-l	8			10	13	12	13	f
HROC87 fT0 M2	16	19		20		8			10	13	12	13	f
HROC87 T0 M2 P25	16			20		8			10.3	13	12		f

Sample Name	D5S818					D13S317			D7S820		D16S539		
HROC87(N)			11.x	12.3			14	17	9			11	
BcHROC87 P11			11.x	12.3			14	17	9			11	
HROC87(T)	8	10	11.x	12.3		13	14	17	9		10	11	12.1
HROC87 fT0 M2	8	10.1				13		17	9		10		12.1
HROC87 T0 M2 P25	8	10.1				13		17	9		10		12.1

Auch bei HROC87 (Tabelle 16) findet sich ein Off-Ladder Allel zwischen den Markern vWA und TH01. Bis auf dieses Off-Ladder Allel stimmen die STR-Profile von N und Bc überein. Das Tumorgewebe zeigt Veränderungen, es weist z.B. im STR-System vWA drei Allele auf. Zwei dieser drei Allele, nämlich Allel 16 und Allel 18, sind auch im STR-Profil des Normalgewebes zu sehen, wobei vWA-18 im Elektropherogramm von T so viel kleiner als bei N ist, dass formal LOH vorliegt (0,39, also  $< 0,5$ . Siehe Diskussion für eine Erklärung der Ratio). Das Allel wurde hier allerdings mit aufgeführt, da es nicht nur noch deutlich sichtbar, sondern auch das Hauptallel ist, aus dem ein kleines neues Allel 20 hervorgeht (MSI). Allel 18 erfährt dabei eine Höhenminderung. Der Locus ist insgesamt schwer zu beurteilen, und es stellt sich die Frage, ob hier tatsächlich LOH vorliegt, oder nur MSI. Ich habe mich nach den Regeln des NCI-Workshops von 1997 (Siehe Diskussion) für MSI entschieden. Beim PDX zeigt sich schließlich an diesem Locus ein im Vergleich zu zwei sehr kleinen Allelen (vWA-19 und vWA-20) sehr großes vWA-16. In Anlehnung an Parson et al. werden aber in dieser Arbeit neue Allele mit einer Ratio  $< 0,25$  (Allel geteilt durch Hauptallel) nicht gezählt, und vWA-19 und

vWA-20 weisen beim PDX eine deutlich kleinere Ratio auf. Somit ist der Locus an dieser Stelle doch als homozygot zu werten.

Während N und Bc bei TPOX, CSF1PO und D16S539 homozygot sind, zeigen T und PDX-Material bei diesen Markern ein heterozygotes Bild. Es wurde bereits erwähnt, dass das Tumorgewebe bei vWA drei Allele aufweist, bei D5S818 sind es sogar vier, und zwar auch wieder die zwei Allele, die sich im Profil des Normalgewebes finden, und neu Allel 8 und Allel 10. Letztere sind dann auch beim PDX-Material zu sehen - Allel 10 und das Punkttallel 10.1 unterscheidet nur 1bp. Ebenso kommt D16S539-11, das sich im STR-Profil von N findet, als eines von drei Allelen im Profil des Tumorgewebes vor. Bei den Markern TH01 und D7S820 gibt es keine Veränderungen. Alle Proben haben beim Geschlechtsmarker Amelogenin den Genotyp X, X.

**Tabelle 17: HROC113 MSI**

Sample Name	VWA		TH01		TPOX		CSF1PO		AMEL
HROC113(N)	15	17	6.1	7.1	7.3	12	12		f
HROC113 P14		17	6.1	7.1	7.3	12	11	13	f
HROC113 T0 M1 P44		17	6.1	7.1	7.3	12	11	13	f

Sample Name	D5S818		D13S317		D7S820		D16S539	
HROC113(N)	11.1		14	15	10	11	10	12.1
HROC113 P14	11.1	14	14	15		12	10	11
HROC113 T0 M1 P44	11.x	14	14	15		12	10	11

Leider fehlt bei HROC113 (Tabelle 17) Tumormaterial, die Tabelle wird aber dennoch gezeigt, da HROC113 MSI aufweist, und es insgesamt im untersuchten MOI-Probengut nicht sehr viele Beispiele für MSI gibt. Es finden sich hier, wenn man die Tumorzelllinie mit dem Normalgewebe vergleicht, bei Ersterer gleich in drei STR-Systemen neue Allele, und zwar bei CSF1PO, D5S818 und D7S820. CSF1PO-12 des Normalgewebes geht verloren und bei der Tumorzelllinie zeigt sich mit 11,13 ein vollkommen neuer Genotyp (Shift um eine Repeat Unit beim ersten Allel des Locus). Die Tumorzelllinie weist im STR-System D5S818 neu Allel 14 auf, und hat somit anders als N einen heterozygoten Genotyp. Bei D7S820 unterscheiden sich die Genotypen von N und Tumorzelllinie ebenfalls. LOH findet sich bei vWA.

**Tabelle 18: HROC123 MSI**

Sample Name	VWA			TH01		TPOX				CSF1PO		AMEL
HROC123(N)	18			8	10	7.3	12			8.3	12	m
HROC123(T)	18		o-l	8	10	7.3	12			8.3	12	m
HROC123 ft0 M1	18		o-l	8	10	7.3	12			8.3	12	m

Sample Name	D5S818			D13S317		D7S820				D16S539	
HROC123(N)	10.1			15			11	12		10	11
HROC123(T)	10.1	11.x		15	16	10	11	12	13	10	11
HROC123 ft0 M1	10.x	11.1		16	17	10			13	10	11

Im STR-System vWA zeigt sich beim Tumormaterial von HROC123 (Tabelle 18) ein im Vergleich zu N neues Off-Ladder Allel. Ebenfalls bei T ist bei D5S818 Allel 11.x neu. Dieses Allel wurde in der Tabelle ausnahmsweise mit aufgeführt, obwohl es so viel kleiner als das Hauptallel ist, dass es an dieser Stelle (noch) nicht relevant ist. Es zeigt aber gut die Entwicklung von D5S818-11.1 beim PDX. Hier ist Allel 11.1 nämlich so groß, dass es eines der beiden Hauptallele darstellt. Bei T taucht im STR-System D13S317 neu Allel 16 auf, während das ursprüngliche Allel 15 kleiner wird (Shift um eine Repeat-Unit). Auch bei D7S820 finden sich neben den beiden schon vom Normalgewebe bekannten Allelen 11 und 12 neu Allel 10 (Minus eine Repeat-Unit von Allel 11) und Allel 13 (Allel 12 plus eine Repeat-Unit).

**Tabelle 19: HROC131 MSI**

Sample Name	VWA			TH01				TPOX			CSF1PO		AMEL
BcHROC131 P9		17	18	10				7.3			11		f
HROC131(T)		17		9.3				7.3			11		f
HROC131 ft0 M4	16.1	17		10				7.3			11	12	f
HROC131 ft0 M3 P4	16.1	17		10				7.3			11		f

Sample Name	D5S818			D13S317				D7S820			D16S539		
BcHROC131 P9	10.1	11.1		14				10		13		7	11
HROC131(T)	10.1	11.x	16	14	15	16		10		13	5.x	8	11
HROC131 ft0 M4	11	12.3	15		15	16	17		11	13	14	5.x	11
HROC131 ft0 M3 P4		12.3			15	16			11	13	14		11

Bei HROC131 (Tabelle 19) gibt es keine Information zum Normalgewebe, aber zu B-Zellen. Es bestehen Unterschiede zwischen dem STR-Profil von Bc und T, und zwar bei den Markern vWA, D5S818, D13S317 und D16S539. Bei vWA kommt es zu LOH, bei den übrigen Markern weist T neue Allele auf, wodurch sich an den jeweiligen Loci drei Allele zeigen. Auch zeigen sich Unterschiede bei den STR-Profilen von T und PDX: Bei vWA weist Letzterer neu vWA-16.1 auf, bei CSF1PO neu CSF1PO-12, womit das PDX hier anders als T einen heterozygoten Genotyp hat. Auch sieht man im Bereich des STR-Systems D5S818 beim PDX einen Shift beim zweiten und dritten Allel. Bei D13S317 fällt Allel 14 weg, Allel 17 kommt neu hinzu. Bei D7S820 fällt Allel 10 weg, Allel 14 kommt neu hinzu. In den STR-Systemen CSF1PO, D5S818, D13S317 und D16S539 kommt es zu Veränderungen, wenn man PDX und PDX-abgeleitete Zelllinie miteinander vergleicht.

**Tabelle 20: HROC159 MSI**

Sample Name	VWA				TH01		TPOX			CSF1PO			AMEL
HROC159(N)	14				8	10		10.3			12	14	f
HROC159(T)	14				8	10	9.x	10.3		11	12	14	f
HROC159 T1 M1	14	15			8	9.3		10.3		11	13	14	f

Sample Name	D5S818				D13S317		D7S820			D16S539		
HROC159(N)	8.x	11.x				14	10	12			10	11
HROC159(T)	8.x	11.x	12.x	13.x		14	10	12		9	10	11.x
HROC159 T1 M1	8		12.x	13.x	13	14	10	12	13	9	10	

HROC159 (Tabelle 20) weist Unterschiede im STR-Profil von N und T auf. In den STR-Systemen CSF1PO und D5S818 weist das Tumormaterial zusätzliche Allele auf. Und auch bei TPOX hat sich der Genotyp des Tumorgewebes im Vergleich zum Normalgewebe geändert und ist nun heterozygot aufgrund eines neuen Punkttallels. D16S539 ist bei T schwer zu beurteilen. Formal liegt an dieser Stelle im Vergleich zu N LOH vor, gleichzeitig kommt (im Vergleich zu N) mit Allel 9 ein neues Allel hinzu, während Allel 11.x kleiner wurde. Es stellt sich die Frage, ob es sich nun um LOH und MSI, oder lediglich im Rahmen von MSI um einen Shift von Allel 11.x zu Allel 9 handelt. Nach den Regeln des NCI-Workshops liegt MSI vor – Allel 9 ist außerdem so groß, dass der Locus nicht als homozygot angesehen werden kann. Beim PDX schließlich finden sich im Vergleich zu T neue Allele, so bei vWA mit Allel 15, bei D13S317 mit Allel 13 und bei D7S820 mit Allel 13.

**Tabelle 21: HROC175 MSI**

Sample Name	VWA				TH01			TPOX		CSF1PO		AMEL
HROC175(T)	18	19			7.1	8		7.3		12		f
HROC175 ft1 M1	18	19.x	20	o-l	7.1	8		7.3		11	13	f

Sample Name	D5S818				D13S317			D7S820		D16S539	
HROC175(T)	10.1				11		14		11	8	10
HROC175 ft1 M1	10.1	12.3			11	13	14	9	10.3	8	11

HROC175 (Tabelle 21) zeigt Unterschiede zwischen Tumor und PDX. Letzterer weist im STR-System vWA, CSF1PO, D5S818, D13S317 und D7S820 – also bei fünf von neun Markern – neue Allele auf.

**Tabelle 22: HROC257 MSI**

Sample Name	VWA			TH01			TPOX				CSF1PO				AMEL
HROC257(N)	17	18		7.1	10		7.3	9					9.3	12	f
HROC257(T)	17	18		7.1	10		7.3	9			8.3	11	9.3	12	f
HROC257 P16	17	18		7.1	10		7.3	9			8.3	11			f
HROC257 T1 M2	17	18		7.1	9.3		7.3	8.x			8.3	11			f
HROC257 T0 M1 P6	17	18		7.1	10		7.3	8.x			8.3	11			f

Sample Name	D5S818			D13S317			D7S820				D16S539		
HROC257(N)	10.1		12.3	11		14		11	12			11	12.1
HROC257(T)	10.x	11.x	12.3	11	13	14	10	11	12	13	10	11	12.1
HROC257 P16		11.x	12.3		13		10			13		11	
HROC257 T1 M2		11.1	12.3	11	13		10			13		11	
HROC257 T0 M1 P6		11.x	12.3	11	13		10			13		11	

HROC257 (Tabelle 22) zeigt gleich mehrere Fälle von offensichtlicher Kontamination des Tumorgewebes durch Normalgewebe, z.B. im STR-System CSF1PO, oder bei D7S820. Fälle von LOH finden sich bei T nicht. Während sich die STR-Profile im Bereich der FAM-gelabelten Marker eher wenig unterscheiden, gibt es im Bereich aller HEX-gelabelten Marker Unterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe - Letzteres weist mehrere neue Allele auf - und zwischen Tumorgewebe und Tumorzelllinie. PDX und PDX-abgeleitete Zelllinie unterscheiden sich nur sehr wenig voneinander.

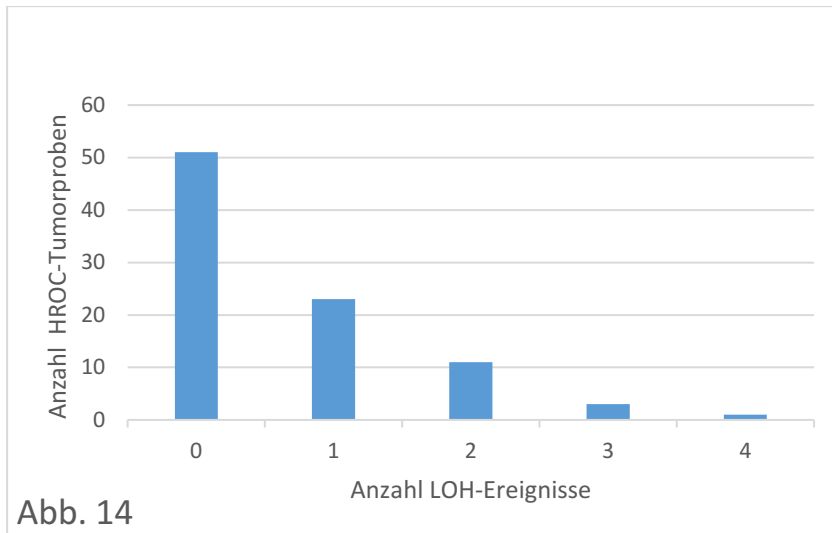
### 3.3 LOH

#### **LOH beim Original-Tumormaterial (sporadische CRC-Fälle)**

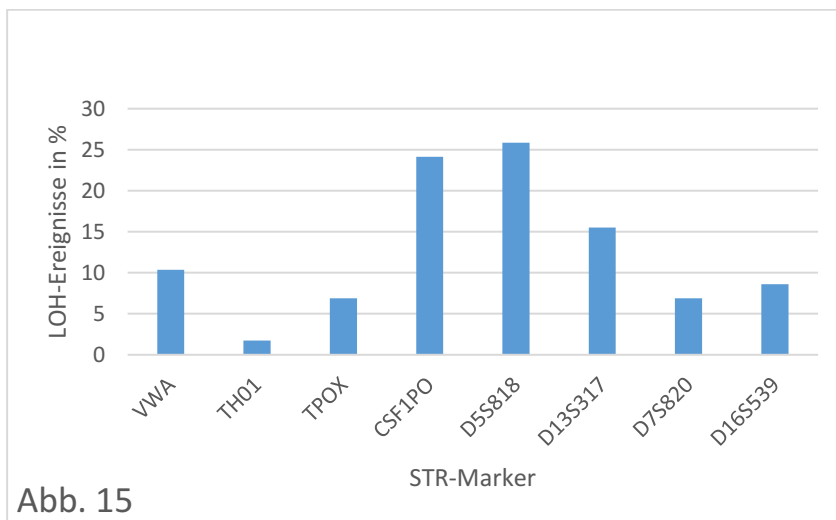
Untersucht wurden 87 Tumorproben und das entsprechende Normalgewebe, darunter 83 Non-MSI und vier MSI-Proben. Es lagen zwei weitere Tumorproben vor, für die allerdings das entsprechende Normalgewebe fehlte. So wurden die besagten zwei Tumorproben mit B-Zell-Proben verglichen – das STR-Profil der B-Zellen stimmt ja mit dem Profil des Normalgewebes überein. Dadurch ergibt sich eine Gesamtprobenzahl von 89, davon 84 Non-MSI und fünf MSI-Proben (Stand Mai 2013). In der Zwischenzeit wurde vom MOI-Labor bestätigt, dass es sich bei vier Proben, deren MSI-Status zu Beginn dieser Arbeit noch nicht bestimmt war, um MSI-H Proben handelt. Bei zwei weiteren Proben besteht ein starker Verdacht auf MSI-H, weshalb diese zu den MSI positiven Proben gezählt wurden. So ergibt sich eine Gesamtprobenzahl von 89, davon 78 Non-MSI und 11 MSI-Proben. Von der Betrachtung ausgenommen wurde der Marker AMEL.

Als eindeutige Fälle galten Loci, die sich im Elektropherogramm der Normalgewebprobe heterozygot darstellen, beim Tumorgewebe hingegen bedingt durch das vollständige Wegfallen eines der beiden Peaks homozygot sind. Diese eindeutigen Fälle wurden nach dem optischen Eindruck als LOH gewertet. In optisch weniger eindeutigen Fällen, in denen sich beide Peaks eines heterozygoten Locus mit unterschiedlicher Peak-Höhe darstellen, wurde nach Cawkwell et al. ein Quotient berechnet, wobei ein Wert  $< 0,5$  als LOH gewertet wurde. Fälle in denen das Normalgewebe einen homozygoten Locus zeigt wurden als nicht informativ angesehen. Zeigen sich an einem Locus LOH und MSI, so wurde dieser bestmöglich beurteilt. Im Zweifelsfall wurde der Locus ebenfalls als nicht informativ gewertet.

Es fanden sich insgesamt 38 Proben mit LOH- Ereignissen. Von diesen 38 Proben mit LOH sind 60,5 % MSS (23 von 38), 28,9 % MSI-L (11 von 38) und 10,5 % MSI-H (4 von 38). Die Non-MSI-Proben kommen also auf 34 Ereignisse, die MSI-Proben auf vier.



In Abb. 14 sieht man: Wenn sich das Phänomen LOH bei den HROC-Tumorproben zeigt, dann meist ein Ereignis pro STR-Profil, sprich ein geänderter Genotyp. Die drei Proben, bei denen sich drei LOH-Ereignisse finden, sind HROC99, HROC147 und HROC245. Bei HROC239 sind es gleich vier. Abb. 15 zeigt die Verteilung der LOH-Ereignisse auf die jeweiligen Marker. Die LOH Ereignisse bei den Non-MSI und MSI-Proben wurden bedacht, sowie die Ereignisse bei den zwei Tumormaterial/B-Zell-Pärchen.

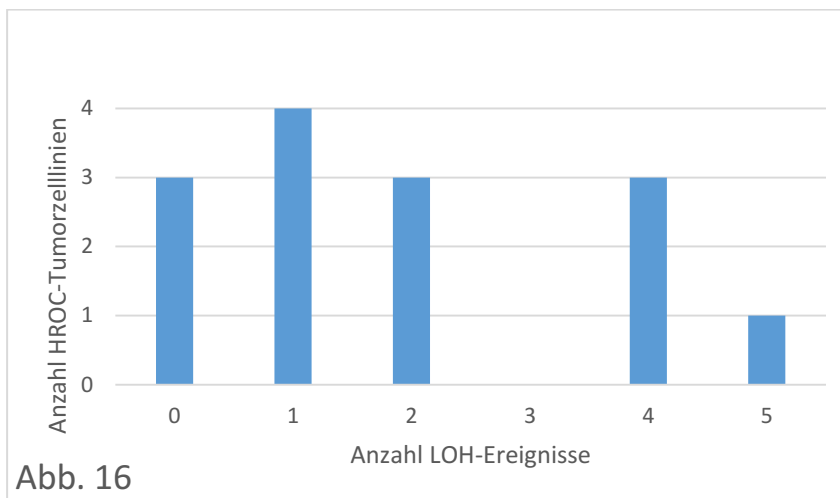


Beginnend mit dem Marker mit der höchsten Ereigniszahl und in absteigender Reihenfolge sortiert ergibt sich folgendes Bild:

D5S818 > CSF1PO > D13S317 > VWA > D16S539 > TPOX = D7S820 > TH01.

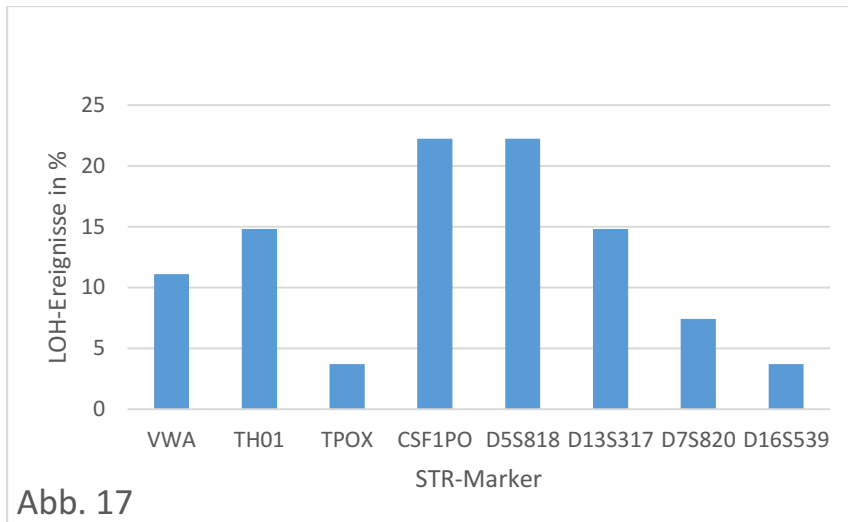
### LOH bei den Tumorzelllinien

Es wurden 10 Tumorzelllinien und das entsprechende Normalgewebe analysiert, davon 6 Non-MSI und 4 MSI-Proben. Unter den MSI-Proben ist ein HNPCC-Fall (HROC113). Bei vier weiteren Proben lag zwar kein Normalgewebe vor, wohl aber B-Zellen, sodass deren STR-Profile verwendet wurden. Es ergibt sich eine Gesamtprobenzahl von 14, davon 10 Non-MSI und 4 MSI-Proben (Stand 2013 um HROC212 als MSI-H aktualisiert). Die Verteilung der LOH-Ereignisse auf die jeweilige Anzahl der Tumorzelllinien-Proben ist in Abb. 16 dargestellt. Die Non-MSI-Proben kommen auf 23 Ereignisse, die MSI-Proben auf vier.



Vier LOH-Ereignisse finden sich bei den Tumorzelllinien von HROC43, 32 und 60. HROC57 kommt auf fünf LOH-Fälle. Abb.17 zeigt die Verteilung der LOH-Ereignisse auf die jeweiligen Marker. Wieder wurden LOH Ereignisse bei Non-MSI und MSI-Proben bedacht, sowie Ereignisse bei den vier Tumorzelllinie/B-Zell-Paaren.



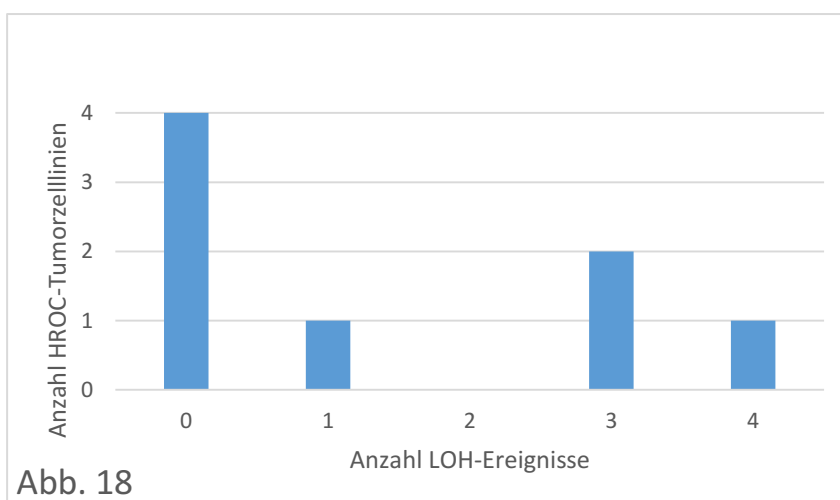


Beginnend mit dem Marker mit der höchsten Ereigniszahl und in absteigender Reihenfolge geordnet ergibt sich:

D5S818 = CSF1PO > D13S317 > TH01 > VWA > D7S820 > TPOX = D16S539.

#### Tumorzelllinien im Vergleich zum Originaltumor

Bei acht Originaltumor/Tumorzelllinie-Paaren - davon sieben Non-MSI Paare und ein MSI-Paar - wurde geschaut, inwieweit sich bei den Tumorzelllinien LOH-Ereignisse zeigen. Von den insgesamt 11 LOH-Fällen gehen alle an Non-MSI-Tumorzelllinien.



In Abb. 18 ist zu sehen, dass sich bei den meisten Tumorzelllinien, bei denen es zu LOH kommt, drei Ereignisse finden. Die zwei Proben mit drei Ereignissen sind HROC40 und 60. HROC43 weist vier LOH-Fälle auf.

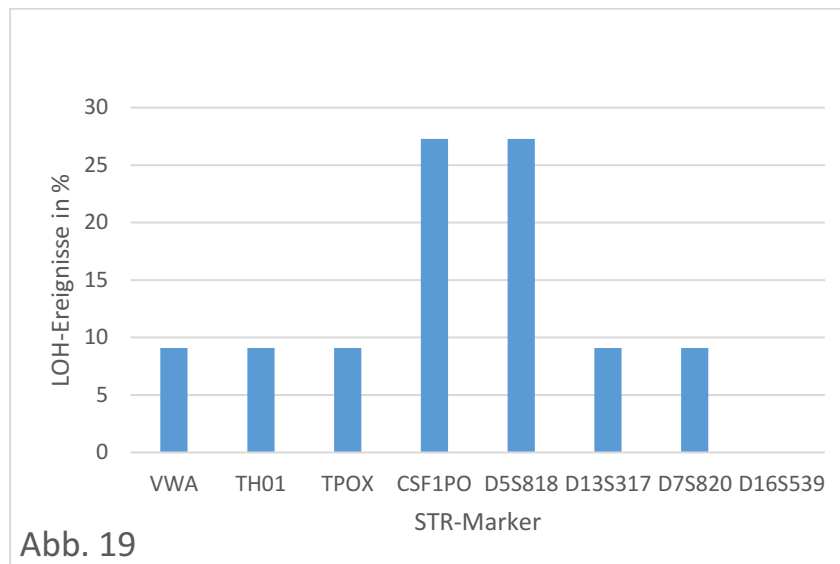
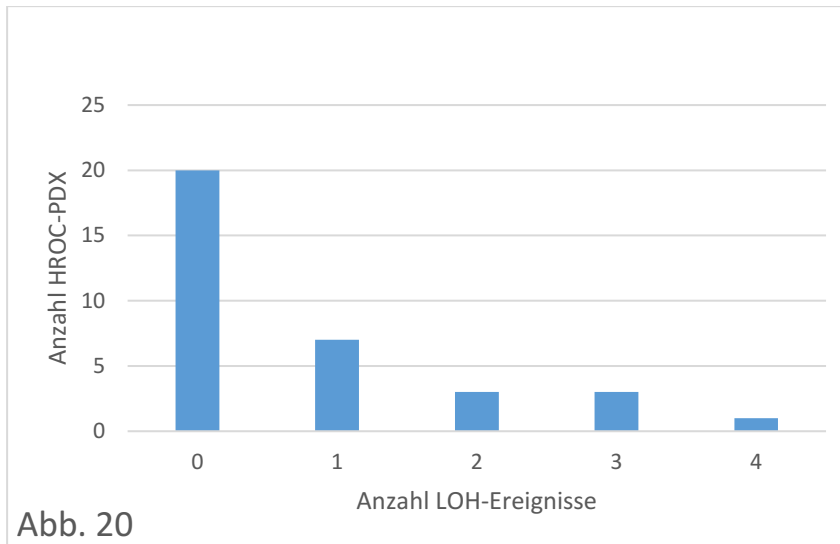


Abb. 19

Zählt man die LOH-Ereignisse bei Non-MSI und MSI-Proben pro Marker (Siehe Abb. 19), so ergibt sich: CSF1PO = D5S818 > D13S317 = D7S820 = VWA = TH01 = TPOX > D16S539.

### PDX– im Vergleich zu Original-Tumoren

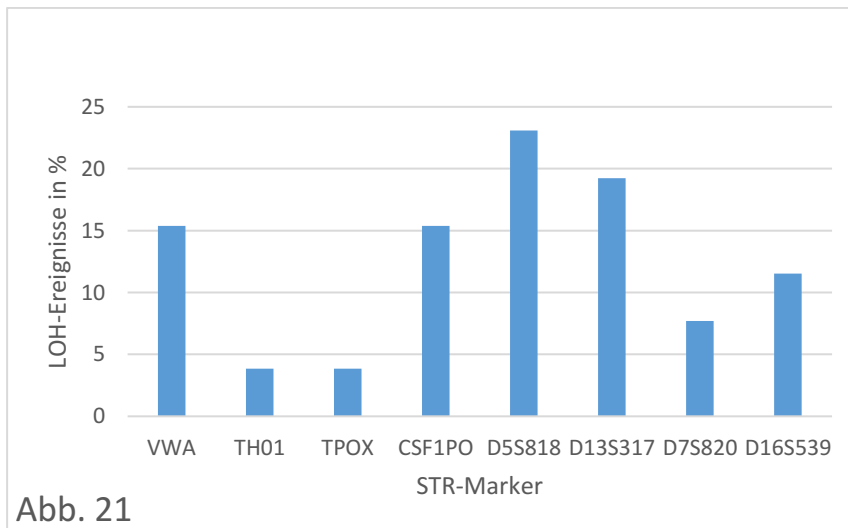
34 PDX/Originaltumor-Paare – davon 25 Non-MSI und 9 MSI-Paare – wurden auf LOH-Ereignisse untersucht (Stand 2013, um HROC170, 171 und 186 als MSI-H aktualisiert). Unter den MSI-H-Proben war ursprünglich mit HROC252 ein HNPCC-Fall. Dieser Fall wurde herausgerechnet, um ausschließlich Ergebnisse für sporadische Tumoren zu erhalten. Von den insgesamt 26 LOH-Ereignissen fallen 20 auf Non-MSI-PDX-Proben und sechs an MSI-PDX. Abb. 20 stellt die Verteilung der LOH-Fälle auf die jeweiligen HROC-PDX dar. Bei den meisten Probenpaaren, bei denen sich der LOH-Phänotyp findet, handelt es sich um ein Ereignis.



Die drei Proben mit jeweils drei Ereignissen sind HROC60, 186 und 260. Vier LOH-Ereignisse gehen an HROC80.

Zählt man die LOH-Ereignisse bei Non-MSI und MSI-Proben pro Marker, so ergibt sich – wie auch in Abb. 21 ersichtlich – die folgende Reihenfolge:

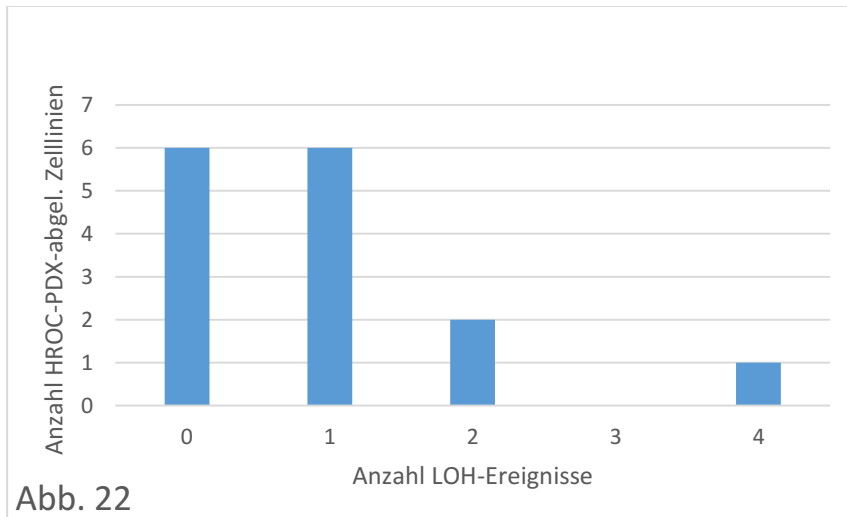
D5S818 > D13S317 > VWA = CSF1PO > D16S539 > D7S820 > TH01 = TPOX.



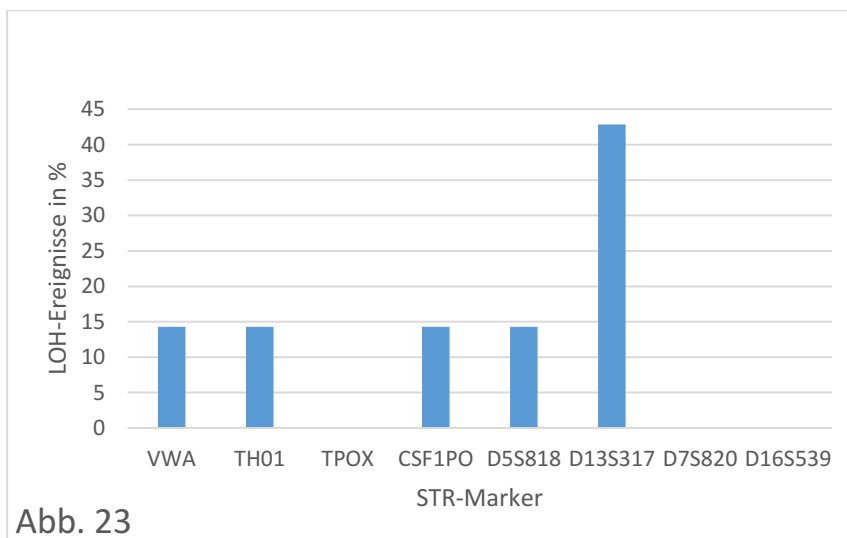
#### **PDX-abgeleitete Zelllinien im Vergleich zu PDX**

Auch 15 PDX-abgeleitete Zelllinien/PDX-Paare, 10 Non-MSI und fünf MSI-Proben, wurden auf LOH-Ereignisse untersucht. Darunter ist mit HROC285 ein HNPCC-Fall. Von den

insgesamt 14 LOH-Ereignissen fallen 12 an Non-MSI-PDX-abgeleitete Zelllinien und zwei an MSI-PDX-abgeleitete Zelllinien. Abb. 22 kann man Folgendes entnehmen: Bei den meisten Probenpaaren, die LOH zeigen, stößt man auf nur ein Ereignis. Die eine Probe mit vier LOH-Fällen ist HROC107.



Zählt man die LOH-Ereignisse bei Non-MSI und MSI-Proben pro Marker, so ergibt sich diesmal (Abb. 23) folgende Reihenfolge: D13S317 > CSF1PO = D5S818 = TH01 = VWA.



### 3.4 Neue Allele

#### **Neue Allele beim Original-Tumormaterial**

Die HROC-Tumorproben wurden auch auf das Auftauchen neuer Allele geprüft. Ursprünglich wurden 87 Tumor/Normalgewebe-Paare untersucht, davon 83 vermeintliche Non-MSI und 4 MSI-Proben (Stand Mai 2013). Es wurden außerdem 2 Proben hinzugenommen, bei denen die STR-Profile des Tumormaterials in Abwesenheit von Normalgewebe mit den STR-Profilen von B-Zellen abgeglichen wurden, darunter eine MSI-Probe. Insgesamt handelt es sich also um 89 Probenpaare (sporadische CRC-Fälle).

Proben, die bei  $\geq$  drei STR-Markern neue Allele aufweisen, wurden als MSI-H angesehen. Veränderungen in weniger Markern wurden als MSI-L gezählt. Kein veränderter Marker bedeutete MSS.

Der MSI-Status mehrerer Proben war zu Beginn dieser Arbeit bereits bekannt. Er wurde von Mitarbeitern des MOI-Labors im Rahmen anderer Arbeiten mittels eines Panels aus sechs Markern (BAT25, CAT25, BAT26, D5S346, D17S250 und D2S123) bestimmt, wobei alle Proben, die sich als nicht MSI-H herausstellten, als MSS eingestuft wurden. Bei der Analyse der HROC-Proben im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich aber, dass sechs Proben, deren MSI-Status zu Beginn dieser Arbeit noch nicht ermittelt war, und die hier daher zunächst unter Non-MSI eingeordnet wurden, ebenfalls bei  $\geq$  drei Markern neue Allele aufweisen und demnach MSI-H sein müssten. Für vier dieser Proben wurde der MSI-H Status inzwischen vom Labor bestätigt. Wie auch schon im vorherigen Unterkapitel wurde diese Aktualisierung bedacht.

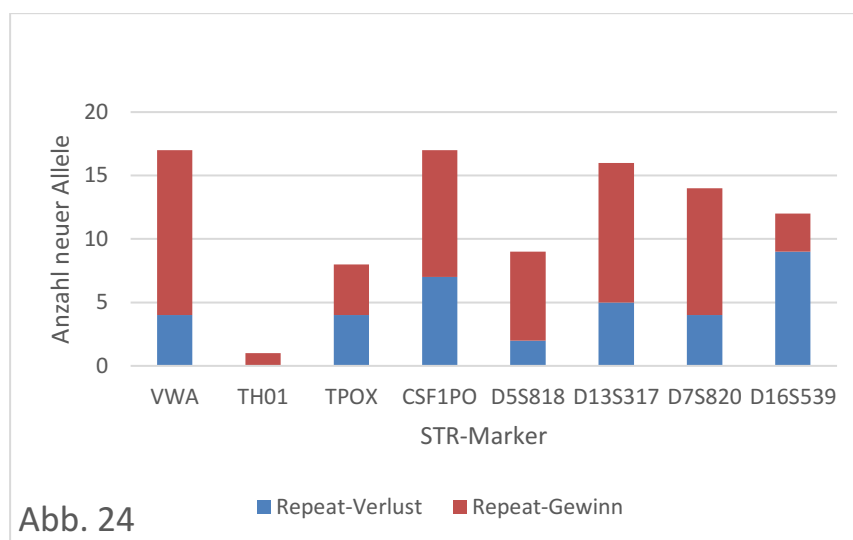
In Anlehnung an Parson et al. 2005 wurde so vorgegangen, dass ein neuer Peak erst ab einem Quotienten von  $\geq 0,25$  als relevant angesehen wurde. Dies war erforderlich, da in einigen Fällen neue Peaks, die von ihrer Position und vom Gesamtzusammenhang her eindeutig Stotter-Produkte waren, bei sehr großen Hauptallelen eine Peak-Höhe aufwiesen, die größer war als 15% der Hauptallel-Peakhöhe. Formal wären diese Allele daher relevant gewesen, aber eben fälschlicherweise, wenn nicht wie oben beschrieben verfahren worden wäre.

Bei der Analyse der Elektropherogramme kann man nun Folgendes beobachten: Was das Auftauchen neuer Allele angeht, so kommt es bis auf einige sehr wahrscheinlich technisch bedingte Ausnahmen zum Zugewinn oder Verlust ganzer Repeats, also immer 4bp. Hauptsächlich geht eine Repeat-Einheit verloren oder kommt hinzu (83%), ein Verlust oder Zugewinn von zwei Repeat-Einheiten oder mehr ist seltener (jeweils 8,5%). Bei der

Bestimmung der Veränderung in Basenpaaren wurde wie bei Hoff-Olsen et al. 1998 geschaut, ob sich im Elektropherogramm ein Höhenverlust bei einem Hauptallel-Peak zeigt. Dieses Allel wurde als das mutierende Allel angesehen, ansonsten das dem neuen Allel am nächsten liegende Hauptallel.

In Abb. 24 ist die Anzahl neuer Allele beim Tumormaterial für die acht STR-Marker dargestellt. Ordnet man die Marker nach der Häufigkeit neuer Allele und führt sie in absteigender Reihenfolge auf, so ergibt sich folgendes Bild:

VWA= CSF1PO> D13S317 >D7S820 > D16S539 >D5S818> TPOX > TH01



Vergleicht man die STR-Profile des Tumorgewebes mit den Profilen des Normalgewebes, so zeigen sich insgesamt 94 neue Allele, davon mehrheitlich ein Zugewinn an Repeat-Einheiten (59 Zugewinn-, 35 Verlust-Ereignisse). Man sieht in Abb. 24 auch, dass es beim Marker D16S539 hauptsächlich zum Verlust von Repeats kommt. Bei TH01 kommen – wenn sich überhaupt neue Allele zeigen – Allele hinzu, die mehr Basenpaare aufweisen als die Ursprungsallele.

In Bezug auf die einzelnen Proben lässt sich sagen, dass alle MSI-Proben, bei denen Normalgewebs- bzw. B-Zell/Tumorgewebs-Elektropherogramme vorliegen, neue Allele in  $\geq$  drei Markern aufweisen. Dabei handelt es sich um neun Proben. HROC123 zeigt lediglich eine Veränderung bei zwei Markern, worauf im Kapitel „Diskussion“ näher eingegangen wird.

Zusammenfassend: Es wurden 89 Probenpaare untersucht, darunter neun MSI-H-Proben (9,9%), plus zwei Proben mit starkem Verdacht auf MSI-H. Zählt man auch Letztere zu MSI-H, so kommt man auf 12,4%. Da es sich bei vier von 84 eingangs als Non-MSI eingestuft

Proben um MSI-H Proben handelt, und bei weiteren zwei Proben der starke Verdacht auf MSI-H besteht, bleiben noch 78 Non-MSI-Proben. Von diesen 78 Proben weisen 56 keine Veränderungen bei den STR-Markern auf, und gelten somit als MSS. Die weiteren Proben, 22 an der Zahl, weisen einen oder zwei veränderte Marker auf und gelten somit als MSI-L. Ein Überblick:

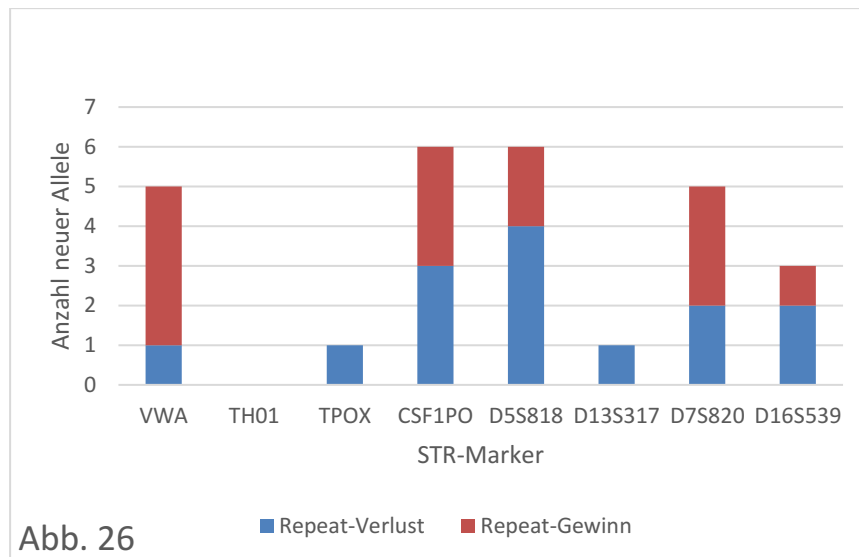
	Anzahl	%
MSI- H	11	12,4
MSI-L	22	24,7
MSS	56	62,9
LOH-H	4	4,5
LOH-L	34	38,2
LOH Total	38	42,7
MSS u. MSI-L (= Non-MSI) mit LOH	34	38,2
MSS u. MSI-L (= Non-MSI) ohne LOH	44	49,4
MSI-H mit LOH	4	4,5
MSI-H ohne LOH	7	7,9
<b>n= 89</b>		

**Abbildung 25:** Zu den Phänomenen MSI und LOH bei 89 analysierten HROC-Tumorproben.

### Neue Allele bei den Tumorzelllinien

Insgesamt 14 Probenpaare wurden auf das Auftauchen von neuen Allelen geprüft, darunter 10 Tumorzelllinie/Normalgewebe-Paare, genauer sechs Non-MSI und vier MSI-Paare. Unter den MSI-Proben ist mit HROC113 ein HNPCC-Fall. Bei den restlichen vier Probenpaaren handelt es sich aufgrund der Abwesenheit von Normalgewebeproben um Tumorzelllinie/B-Zell-Paare (Non-MSI). Die Ergebnisse sind in Abb. 26 dargestellt. Für die Marker-Reihenfolge ergibt sich hier:

CSF1PO= D5S818 > VWA=D7S820 > D16S539 > D13S317 = TPOX > TH01.



Von den insgesamt 27 neuen Allelen weisen 14 weniger Basenpaare auf als das Ursprungsallel. Ein Zugewinn an Repeat-Einheiten konnte bei 13 neuen Allelen beobachtet werden. Bei TPOX und D13S317 kommt es ausschließlich zum Repeat-Verlust. Von den drei hier untersuchten MSI-Proben zeigen alle neue Allele in  $\geq$  drei Markern. HROC212, deren MSI-Status zu Beginn dieser Arbeit ebenfalls nicht vorlag, und die daher unter Non-MSI geführt wurde, zeigt allerdings auch neue Allele bei vier Markern, was die Vermutung nahelegt, dass diese Probe MSI-H ist. Dieser Verdacht wurde inzwischen vom Labor bestätigt.

Für HROC18, HROC32 und HROC60 liegen jeweils zwei Tumorzelllinien unterschiedlicher Passagen vor. Während sich die STR-Profile von HROC18 bei P13 und P37 entsprechen, und sich auch bei HROC60 keine Unterschiede im STR-Profil von P7 und P32 zeigen, unterscheidet sich das STR-Profil von HROC32 P11 und HROC32 P42 bei zwei Markern, wo sich bei der höheren Passage neue Allele finden (CSF1PO, D5S818). Bei TH01 ist Allel 9.1 bei der höheren Passage so klein, dass es nicht mehr als relevant angesehen werden kann.

### Tumorzelllinie im Vergleich zum Originaltumor

Angeschaut wurden sieben Non-MSI-Paare und ein MSI Tumorzelllinie/Tumormaterial-Paar. Es kommt lediglich zu drei neuen Allelen, davon jeweils ein Ereignis bei vWA, CSF1PO und D5S818 (alle bei Non-MSI-Proben, zwei Verluste von jeweils einem Repeat, ein Zugewinn von einem Repeat).

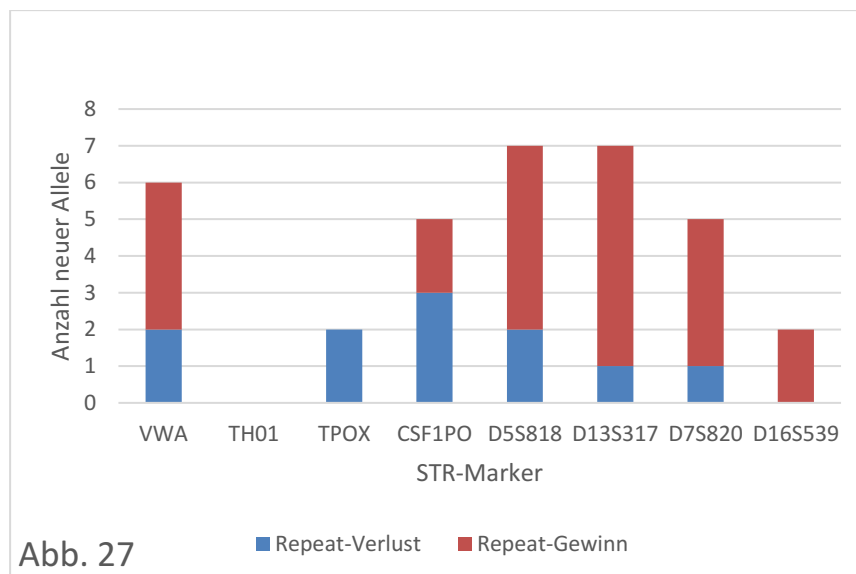


### PDX im Vergleich zu Original-Tumoren

34 PDX/Originaltumor-Paare wurden untersucht, darunter 25 Non-MSI und 9 MSI-Paare. Unter den Proben war ursprünglich mit HROC252 ein HNPCC-Fall, der herausgerechnet wurde, um Ergebnisse bezüglich sporadischer CRC-Fälle zu erhalten. Insgesamt tauchen 34 neue Allele auf, wobei es mehrheitlich zu einem Zugewinn an Repeat-Einheiten kommt: 23 Repeat-Zugewinne, 11 Repeat-Verluste. Marker TPOX zeigt wie bei der Prüfung der Tumorzelllinien auch bei den PDXs lediglich neue Allele, die weniger Basenpaare haben als das Hauptallel (Siehe Abb. 27). D16S539 zeigt lediglich Repeat-Zugewinne. Ordnet man die Marker nach der Anzahl der bei ihnen neu vorkommenden Allele, so ergibt sich:

D5S818 = D13S317 > VWA > CSF1PO = D7S820 > TPOX = D16S539 > TH01.

Wie auch schon bei den letzten STR-Profilvergleichen ist TH01 Schlusslicht, was neue Allele angeht.



### PDX-abgeleitete Zelllinien im Vergleich zu PDX

15 PDX-abgeleitete Zelllinien/PDX-Paare wurden auf der Suche nach neuen Allelen bei der PDX-abgeleiteten Zelllinie unter die Lupe genommen, darunter 10 Non-MSI und fünf MSI-Proben. Unter den Proben ist mit HROC285 ein HNPCC-Fall. Bei den Non-MSI Proben

tauchen gar keine neuen Allele auf, bei den MSI-Proben insgesamt drei, und zwar alle bei HROC24 (Marker vWA, D13S317, D16S539).

#### 3.5 Genotypisierung weiterer (nicht HROC-) Proben

Drei Normal-/Tumorgewebe-Paare des Pankreas-Karzinoms (HROP17, HROP27 und HROP41) sowie ein B-Zell/Tumorgewebe Paar (HROP04) wurden untersucht. Phänomene wie LOH oder neue Allele wurden hier nicht beobachtet. Das gleiche gilt für drei HROHep-Probenblöcke (Leberkarzinom). Auch hier wurden die STR-Profile von Normal-/Tumorgewebe-Paaren erstellt (HROHep01, HROHep03, HROHep06). Zu HROHep03 gab es auch eine Tumorzelllinien-Probe. Erneut wurde weder LOH noch das Auftauchen neuer Allele beobachtet. Ferner wurden fünf Glioblastom B-Zell/Tumorgewebe-Paare untersucht (HROG02, HROG07, HROG17, HROG24 und HROG33). Auch hier entsprechen sich die STR-Profile der B-Zellen und des Tumorgewebes in allen STR-Systemen und beim Geschlechtsmarker Amelogenin.

Bei der Auswertung der STR-Profile sowohl der HROCs als auch der weiteren analysierten Proben fand sich kein Hinweis auf eine Probenvertauschung vonseiten des MOI-Labors. In Einzelfällen, die später in der Fehleranalyse besprochen werden, wurden wahrscheinlich einige wenige Proben beim Pipettieren für die PCR vertauscht.

#### 3.6 Amelogenin

Nachdem bei der Vorstellung der einzelnen HROC-Probenblöcke mitunter auch auf Änderungen des Genotyps beim Geschlechtsmarker AMEL hingewiesen wurde, ist es interessant sich anzuschauen, bei wie vielen HROC-Probenblöcken insgesamt eine solche Änderung verzeichnet werden konnte. Für einen besseren Überblick wurden die Probenblöcke in zwei Kategorien eingeteilt, nämlich in kleine Probenblöcke à zwei bis drei Proben, und in große Probenblöcke mit jeweils mehr als drei Proben. Das untersuchte HROC-Probengut enthält 93 kleine und 24 große Probenblöcke. Sehr wenige Proben kommen darüber hinaus einzeln vor. Die Ergebnisse beim Geschlechtsmarker Amelogenin wurden mit den Angaben zum Patientengeschlecht in der Norddeutschen Tumorbank abgeglichen. Abweichungen finden sich lediglich bei HROC135, einer einzeln vorliegenden PDX-Probe (Originaltumor-Genotyp

X,Y; PDX-Genotyp X,X). Bei vier der kleinen Probenblöcke konnte eine Änderung, den AMEL-Genotyp betreffend, beobachtet werden. Da zwei Veränderungen allerdings Fehler sein müssen, deren Ursache in der Fehleranalyse näher beleuchtet wird, reduziert sich die Anzahl der Veränderungen auf zwei (2,2 % der kleinen Probenblöcke). Auch finden sich Veränderungen in sieben großen Probenblöcken (29,2% der großen Probenblöcke). Betrachtet man alle Probenblöcke gemeinsam, so findet sich in 7,7% der Probenblöcke eine Änderung beim Geschlechtsmarker Amelogenin, d.h. das Normalgewebe oder alternativ B-Zellen haben den Genotyp X,Y, während z.B. die dazu passende Tumorzelllinie einen X,X-Genotyp aufweist. Zur Beantwortung der Frage, auf welcher Ebene die Veränderung hauptsächlich auftritt: In den betroffenen kleinen Probenblöcken ist leider kein Tumorzelllinien-Material enthalten. N und T haben den gleichen Genotyp, die Änderung zeigt sich beim PDX. Bei vier der sieben großen Probenblöcke zeigt sich die Änderung auf Höhe der Tumorzelllinie, bei den übrigen drei jeweils auf unterschiedlichen Ebenen (1x auf Ebene von T, 1x auf Ebene des PDX und 1x bei der PDX-abgeleiteten Zelllinie), wobei in zwei Probenblöcken kein Tumorzelllinien-Material vorhanden ist. Bei den Probenblöcken, die aber Tumorzelllinien-Material enthalten, findet sich die Änderung im AMEL-Genotyp hauptsächlich bei der Tumorzelllinie. Wenn man sich anschaut, wie viele der 350 HROC-Proben bei Amelogenin nicht den Genotyp aufweisen, der laut Auszug aus der Norddeutschen Tumorbank dem Patientengeschlecht entspricht, so handelt es sich um 18 Proben (5,1%).

## 4 Diskussion

Im Zuge dieser Arbeit wurde eine Genotypisierung der HRO-Tumormodelle vorgenommen, wobei der Schwerpunkt, da die Proben nahezu ausschließlich HROC-Proben waren, auf dem Kolonkarzinom liegt.

So wie man in der Forensik unterschiedliche Körperflüssigkeiten eines Individuums untersuchen kann, also z.B. Blut, Speichel und/oder Samen, und daraus STR-Profile erstellen kann, so kann man auch unterschiedliche “Materialien“ zu einem Kolonkarzinom untersuchen, das mit einer Nummer versehen wurde und daher beispielsweise HROC18 heißt. Wurde von dem Patienten mit dem Kolonkarzinom HROC18 intraoperativ (oder z.B. in einer Koloskopie) eine Normalgewebeprobe entnommen, so kann man daraus ebenso ein STR-Profil erstellen wie aus B-Zellen aus dem Patientenblut oder aus Tumormaterial, das als PDX in immundefizienten Mäusen propagiert wurde. Der Weg von der gDNA bis hin zum fertigen Elektropherogramm

wurde im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben. Die interessantesten Probenblöcke wurden im Ergebnisteil gezeigt, und es wurden anhand der Phänomene LOH und MSI Unterschiede in den STR-Profilen der jeweiligen Materialien aufgezeigt. Grundsätzlich ist das Vorgehen - das Erstellen von DNA-Fingerprints und das Vergleichen derselben - nicht neu. So wurde in Bezug auf das CRC bereits in den 90er Jahren und früher vorgegangen, wenn auch damals mit noch anderen (PCR)-Methoden (Peinado et al. 1992).

### 4.1 Tumormodelle und die Frage: Wie entsteht Krebs?

Anfang der 70er Jahre analysierte Alfred Knudson die Daten von 48 Patienten des MD Anderson Hospitals in Houston. Es waren Daten von kleinen Patienten, die eines gemeinsam hatten: Sie waren am Retinoblastom erkrankt, einem angeborenen malignen Tumor der embryonalen neuronalen Retina. Dieser Tumor, der nur bei Säuglingen und Kleinkindern diagnostiziert wird, kann entweder hereditär auftreten und folgt dann einem autosomal dominanten Erbgang, oder er tritt sporadisch auf. Im letzteren Fall ist der Tumor unifokal und nur in einem Auge zu finden, im ersteren Fall ist der Tumor multifokal und kann beide Augen betreffen (Niemeyer und Rössler 2013). Knudson berechnete unter anderem die Wahrscheinlichkeit, dass sich eine Zelle mit geerbter Mutation im Retinoblastom-Gen RB1 zur Tumorzelle entwickelt. Und er stellte die Hypothese auf, dass es – zumindest beim Retinoblastom- zwei Mutationsereignisse gibt, auf die die Krebsentstehung zurückzuführen ist. Bei der hereditären Form stellt eine Keimbahnmutation im RB1-Gen das erste Mutationsereignis dar, dann bedarf es einer zweiten, somatischen Mutation. Für das sporadisch auftretende Retinoblastom wären zwei somatische Mutationsereignisse ursächlich (Knudson 1971). Mehrere Jahre später beleuchtete er sein „two hit model“ vor dem Hintergrund neuerer wissenschaftlicher Erkenntnisse. In Bezug auf die Tumorgenese des CRC ist zu diesem Zeitpunkt das Modell von Fearon und Vogelstein, von dem gleich noch die Rede sein wird, längst bekannt. Sie passt in ihrer Gesamtheit nicht zu Knudsons Hypothese von nur zwei Ereignissen. Was Knudsons zweites Ereignis angeht, so kam man an dieser Stelle weiter und fand in der Zwischenzeit mit Hilfe von RFLPs, dass es sich um ein lokales Ereignis handeln könnte, um eine Deletion, eine somatische genetische Rekombination oder um den Verlust eines Chromosoms 13. Jedenfalls findet sich beim Retinoblastom, sowohl bei der hereditären als auch bei der sporadischen Form, keine normale Kopie des Tumorsuppressor- Gens RB-1 (Knudson 1996). Beim Wilms-Tumor, auf den Knudson seine Hypothese unter anderem auch

ausgedehnt hatte, ist das so nicht ganz der Fall. Was den Ursprung einiger Tumoren angeht, so hätte aber die Zwei-Mutationen-Theorie bei der Unterscheidung von hereditären und sporadischen Formen einen guten Rahmen geliefert, und sei daher nützlich gewesen. Ferner hätte das Retinoblastom beim Nachdenken über Karzinogenese als nützliches Modell gedient, so Knudson.

Anfang der 90er Jahre wird in einem Review ein weiteres genetisches Modell für die Tumorgenese, diesmal des CRC, veröffentlicht. Hier wird nicht nur geschildert, dass die Entwicklung des CRC schrittweise abläuft, von normalem über hyperproliferatives Kolonepithel hin zum frühen Adenom, und weiter über einen Zwischenschritt und die Phase des späten Adenoms zum Karzinom, sondern auch, welche genetischen Veränderungen bei den einzelnen Entwicklungsschritten eine Rolle spielen (Fearon und Vogelstein 1990). Das Modell besagt, dass für den Schritt vom normalen zum hyperproliferativen Epithel mitunter eine Mutation oder der Verlust des "FAP-Gens" auf Chromosom 5q (FAP für Familiäre adenomatöse Polyposis), heute APC genannt, ursächlich ist. Mutationen im KRAS-Onkogen im frühen Adenom führen zum Voranschreiten der Tumorgenese, auf deren Weg es noch zu einem möglichen Wegfallen des DCC-Gens auf Chromosom 18q kommen kann, und zum Verlust des p53 Tumorsuppressors auf Chromosom 17p. Die im Modell geschilderten Veränderungen stellen die groben Eckpfeiler dar, wobei es laut den Autoren weniger auf die Reihenfolge als auf die Anhäufung der genetischen Veränderungen ankommt, und die genaue Anzahl dieser Veränderungen nicht bekannt war.

Diese Tumorgenese-Modelle werden hier aus zwei Gründen geschildert. Einmal weil die Beobachtung, dass beim CRC Tumorsuppressorgene auf den Chromosomen 5q, 18q und 17p durch den Verlust von Allelen ausgeschaltet werden, dazu führte, dass Forscher in Tumoren verstärkt nach LOH suchten, in der Hoffnung, so möglichst viele Tumorsuppressor-Gene zu entdecken (Tomlinson et al. 2002; Koreth et al. 1996). Diese Diskussion wird sich mit dem Phänomen LOH später näher beschäftigen, auch da es sich um ein Phänomen handelt, das bei der Auswertung nahezu jeden Probenblocks eine Rolle spielte. Tomlinson et al. schreiben ferner, dass LOH-Studien insgesamt betrachtet nicht in dem Maße entscheidende Erkenntnisse lieferten, wie man es sich erhofft hatte. Und dass sich die Forschung eventuell zu sehr versteift hat auf Modelle wie die Theorie von den zwei Mutationen. Zum Ersteren: Trotz alledem spielt LOH – und das stellen Tomlinson et al. ja auch nicht in Frage – eine entscheidende Rolle bei der Tumorgenese und es besteht grundsätzlich ein Zusammenhang zwischen dem Grad an LOH und der Tumorprogression (Boland und Goel 2010). Zum Letzteren: Tumorgenesemodelle –

und das ist auch der zweite Grund dafür, dass ich die beiden Modelle geschildert habe - entwickeln sich weiter oder sind nicht auf jeden Tumor anwendbar. Heutzutage gilt, dass nur wenige CRSs dem Weg folgen, der im Modell von Fearon und Vogelstein beschrieben wurde (Boland und Goel 2010).

Zur Entwicklung neuer Tumorgenese Modelle braucht man unter anderem zum Beispiel *in vitro* Tumormodelle wie Tumor- und PDX-abgeleitete Zelllinien, und/oder *in vivo* Modelle wie PDX, kurz Modelle, die auch in dieser Arbeit untersucht wurden. Schon seit Jahrzehnten werden Tumorzelllinien in der Krebsforschung als *in vitro* Modelle eingesetzt, da sie genetische Veränderungen aufweisen, die sich auch beim Primärtumor finden. Man spricht in diesem Zusammenhang vom genomischen Profil der Tumorzelllinie. Und es gibt Hinweise, dass PDX als Modelle der Tumorbilogie noch näher kommen (Goodspeed et al. 2016; Mouradov et al. 2014). Sie werden genutzt um das Verhalten von Metastasen zu untersuchen, Zellklone mit unterschiedlichen Eigenschaften zu selektieren, die Reaktion auf Therapeutika zu beobachten oder die Interaktionen zwischen Tumor- und Stromazellen zu beleuchten (Pathak et al. 1998). Tumorzelllinien haben laut Goodspeed et al. neben der Nützlichkeit in experimentellen Studien den Vorteil der leichten Handhabbarkeit. Auch verursachen sie geringe Kosten. All das trägt mit dazu bei, dass Tumorzelllinien in der Krebsforschung die am häufigsten genutzten Modelle sind, und das schon seit Jahrzehnten (Domcke et al. 2013). Ein weiterer Aspekt spielt bei der Nutzung von Zelllinien eine Rolle: Durch *in vitro* Versuche, sei es nun in der Medizin, im Rahmen pharmazeutischer Studien oder in der Kosmetikindustrie, lässt sich die Anzahl von Tierversuchen deutlich reduzieren, wenngleich auf Letztere nicht vollkommen verzichtet werden kann (Dirks et al. 2005). Aus dem Paper von Dirks und Kollegen stammt auch das folgende, an dieser Stelle gut passende Zitat: „Der Wert eines *in vitro* Tests hängt davon ab, wie gut er das *in vivo* System repräsentiert und auch von der strikten Qualitätskontrolle der verwendeten Zelllinien.“

Letztendlich ist es so, wie es bereits in der Einleitung dieser Arbeit angeschnitten wurde: Aus der wissenschaftlichen Arbeit mit Modellen, seien es nun *in vitro* oder *in vivo* Modelle, entstehen Publikationen, welche wiederum Auswirkungen auf die Klinik und somit auf Patientenschicksale haben. Es ist also von entscheidender Bedeutung, dass es in Laboren nicht zur Vertauschung von beispielsweise Tumorzelllinien kommt. Auch um dazu beizutragen, mögliche Fälle von Probenvertauschungen im MOI-Labor zu verhindern bzw. rechtzeitig aufzudecken, wurden STR-Profile erstellt. Und dabei Phänomene wie LOH oder das Auftauchen neuer Allele beobachtet.

### 4.2 STR-Profil bei Tumorzellen: Was ist besonders?

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist das STR-Profiling eine Methode, die weltweit vor allem in forensischen Laboren genutzt wird. Man kann aber nicht alle Prinzipien, die für die Forensik gelten, eins zu eins auf andere STR Einsatzgebiete übertragen. So ist es in der Forensik nicht selten, dass DNA in einer Probe aus mehr als einer Quelle stammt. Es könnte sich z.B. um die DNA von Täter und Opfer handeln, um eine gemischte Probe also (engl. mixed sample, mixture).

#### **Multiple Allele an einem Locus**

Ein Forensiker kann beim Blick auf ein Elektropherogramm recht schnell erkennen, ob der Verdacht auf eine gemischte Probe besteht. Sieht er an einem Locus mehr als zwei Allele, so ist das sehr verdächtig, da humane DNA aus einer Quelle (gesunde Individuen) passend zu einem diploiden Genom normalerweise nur zwei Allele pro Locus aufweist (Dirks et al. 2005). Zeigen sich nun aber außergewöhnlich viele Allele in einem Profil, so macht es einen Unterschied, ob sich diese mehr als zwei Allele an den meisten Loci des Profils zeigen, oder eben nur an einem Locus. Ist Ersteres der Fall, so ist das tatsächlich ein Indiz für eine gemischte Probe oder ein Hybrid. Ist Letzteres der Fall, dann ist die Ursache wahrscheinlich eine Trisomie oder – und das ist beim MOI-Probengut wichtig – ein Genduplikationsereignis (Masters et al. 2001; Masters und Mitglieder der Arbeitsgruppe ASN-0002 der ATCC SDO 2010). Im hier untersuchten Probengut wurden multiple Allele an einem Locus beispielsweise bei der HROC43 Tumorzelllinie im Locus vWA gefunden, im HROC24 Tumor im Locus D5S818, und im HROC87 Tumor in vWA und D5S818.

Ist das zusätzliche Allel, also im Elektropherogramm der zusätzliche Peak, größer als 15% des größten Peaks an einem Locus, dann ist der Peak relevant, da sog. “Stotter“- Produkte (engl. stutter products) normalerweise sehr klein sind, kleiner als 15% des größten Peaks (Gill et al. 1997) . Manche Autoren ziehen die Grenze auch bei 10% oder 11% , und eine Arbeitsgruppe hat Allele in Stotter-Position ab einer Peak-Höhen-Ratio (dazu gleich mehr) von  $\geq 0,25$  als “Nicht-Stotter“ gezählt (Hoff-Olsen et al. 1998 ; Parson et al. 2005). Zur Erklärung des Begriffs Stotter-Position: Stotter-Allele sind immer 4bp – also eine Repeat Unit – kleiner als das Hauptallel, vor dem sie folglich im Elektropherogramm liegen (Lygo et al. 1994). Dies

lässt sich mit dem sog. „Slipped strand displacement model“ erklären. Demnach fällt die DNA-Polymerase vom Komplementärstrang, den sie synthetisiert, woraufhin DNA-Einzelstrang und Komplementärstrang auseinander gleiten. Sie verbinden sich später wieder. Dabei macht der DNA-Einzelstrang aber eine Schleifen-ähnliche Struktur, wodurch Einzel- und Komplementärstrang schließlich um eine Repeat-Einheit verrutschen (Walsh et al. 1996 ; Hauge und Litt 1993).

Nützlich ist das Wissen um die 15% -Regel z.B. beim Betrachten der Elektropherogramme zu HROC87. Die dazugehörigen DNA-Profile finden sich in Tabelle 16, die Elektropherogramme wurden dieser Arbeit aus Umfangsgründen nicht beigelegt. Was man dort aber das Tumorgewebe betreffend sieht, ist im Bereich des Markers vWA ein im Vergleich zu den zwei weiteren Allelen dieses Locus deutlich kleineres Allel 20. Hier stellt sich die Frage, ob dieses Allel nun relevant ist oder nicht – der Locus hat schon zwei Allele. Für Allel 20 kommt man auf 19,7% der Höhe des größten Peaks, womit Allel 20 – wenn auch etwas knapp – formal kein Stotter-Produkt ist und relevant. Bei Allel 19 und Allel 20 des HROC87 PDX ist es ähnlich, beide Peaks scheinen im Vergleich zu zwei weiteren Allelen im STR-System vWA sehr klein, sind aber relevant.

#### **Unausgewogene Peak-Höhen bzw. Peak-Höhen Imbalancen**

Um aber noch einmal auf den Forensiker zurück zu kommen: Eine weitere Frage, die sich ihm dann stellt, betrifft ebenfalls die Peak Höhen. Es gibt einen sog. Peak-Höhen-Quotienten (PHR für Peak Height Ratio). Dieser wird in Leitlinien beschrieben, die eine anerkannte Expertengruppe, die SWGDAM (Scientific Working Group on DNA Analysis Methods) erstellt hat. Man soll so vorgehen, dass man die Peak-Höhe eines Allels mit einem kleineren RFU-Wert (RFU= relative fluorescence units) durch die Peak- Höhe mit einem höheren RFU-Wert teilt, und dann diesen Wert mit 100 multipliziert, um die PHR als Prozentzahl auszudrücken (SWGDAM 2010). Etwas einfacher ausgedrückt teilt man die Höhe des kleineren Peaks durch die Höhe des größeren Peaks – dieser stellt 100 % dar – und multipliziert alles mit 100. Und es stimmt schon: Um wie oben beschrieben zu entscheiden, ob ein Peak relevant ist oder nicht, geht man rechnerisch im Grunde gleich vor. John Butler schreibt dazu in Bezug auf heterozygote Allele, dass bei zwei Peaks der kleinere von beiden mindestens 70% des größeren Peaks betragen sollte (Butler 2001, S. 105). Man spricht dann von sog. ausgewogenen oder ausbalancierten Allelen (engl. balanced alleles). Diese erhält man bei der STR-Analyse der



DNA eines gesunden Individuums. Die DNA stammt in diesem Fall also aus einer Quelle. Der andere Fall, eine sog. Peak-Höhen Imbalance (peak height imbalance), ist bei DNA aus einer Quelle unüblich, wenn diese Quelle gesund ist, sprich kein Tumorgewebe. Es besteht dann in der Forensik vor allem der Verdacht auf eine gemischte Probe.

Auf dem Gebiet der Zelllinien-Überprüfung mittels STR hätte es bei unsauberem Arbeiten im Labor natürlich auch zur Proben-Kontamination mit der DNA des Untersuchers kommen können. Und würden sich bei einer Probe von Normalgewebe an einem Locus drei Peaks zeigen, so wäre es denkbar, dass - ebenfalls aufgrund von unsauberem Arbeiten - DNA, die eigentlich in eine andere Probe gehört hätte, mit in die besagte Probe gelangt wäre. Auch dann könnte sich eine gemischte Probe ergeben. Ganz so einfach ist es allerdings auch wieder nicht, da Normalgewebe nicht selten auch ohne Kontamination bei der Probenanalyse an einem Locus drei Allele aufweist. Mit diesem Punkt wird sich der übernächste Absatz befassen, das Thema Proben-Kontamination wird uns bei der Fehleranalyse wieder begegnen. Gibt es weitere Gründe für unausgewogene Peak-Höhen? Ja, etwa die Anwesenheit von zusätzlichen Kopien von Allelen und eine unterschiedliche Effizienz bei der Amplifikation an heterozygoten Loci, z.B. wegen einer Mutation an der Primer-Bindungsstelle (Masters et al. 2001; Masters und Mitglieder der Arbeitsgruppe ASN-0002 der ATCC SDO 2010). Diese Gründe sind in Bezug auf das MOI-Probengut wichtig, da hier anders als in der Forensik hauptsächlich mit Tumorzellen gearbeitet wurde, welche beim DNA-Fingerprint Besonderheiten aufweisen. Und eine dieser Besonderheiten ist, dass unausgewogene Peak-Höhen an heterozygoten Loci bei Tumorzellen nicht selten, sondern sogar typisch für Tumorzellen sind, und im Vergleich zu normalen Zellen die relativ hohe genomische Instabilität der Tumorzellen widerspiegeln (Masters et al. 2001). Ein Beispiel für unausgewogene Peak-Höhen findet sich im Elektropherogramm der HROC57 Tumorzelllinie beim Marker vWA (Siehe Abb. 12, Anhang).

### 4.3 LOH

Was ist bei Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen noch besonders? „Tumorzellen zeigen oft LOH (das heißt den Verlust eines Allels, welcher nicht leicht von Homozygotizität unterschieden werden kann) und können aufgrund von DNA Duplikation mehrere Kopien von Allelen aufweisen. Gleichzeitig können Tumorzelllinien während der Kultivierung eine Allel-Kopie verlieren oder seltener hinzugewinnen.“ (Masters und Mitglieder der Arbeitsgruppe

ASN-0002 der ATCC SDO 2010). In diesem Zitat stecken gleich mehrere Aspekte, wobei auf multiple Allele an einem Locus bereits eingegangen wurde. Wenn LOH eine Besonderheit von Tumorzellen ist, dann dürfte es dieses Phänomen bei Normalgewebe nicht geben, und es gibt mehrere Arbeiten, die diese Ansicht unterstützen (Rubocki et al. 2000). Demnach wäre es verdächtig gewesen, wenn sich LOH beim Vergleich des STR-Profiles von N und Bc bzw. TiBc gezeigt hätte.

Dies war auch nicht der Fall, dass aber auch Normalgewebe für Tumorzellen typische Veränderungen aufweisen kann, fanden Lindfors et al. bei der Untersuchung von 36 CRCs: 36% der Biopsien von normaler Darmmukosa zeigten LOH und k-ras-Mutationen, in einem der 36 Fälle wurde MSI im Normalgewebe gefunden (Lindfors et al. 2003). Vauhkonen et al. haben 41 Tumore des Gastrointestinaltraktes untersucht und im Zuge dessen jeweils auch Normalgewebeproben. Bei Letzteren sind auch sie auf eine Probe gestoßen, die an einem Locus drei Allele aufwies, ebenso wie das dazu passende Tumorgewebe. Die Autoren führen dies auf eine sporadische Mutation im normalen Kolonepithel zurück. Alternativ könnte es sich – wie weiter oben bereits erwähnt - um eine Kontamination handeln, oder um eine Invasion des Tumorgewebes (Vauhkonen et al. 2004).

Clayton et al. haben nicht in der Krebsforschung, sondern in der Forensik Loci mit drei Allelen untersucht. Sie analysierten 342 Proben, drei Allele kamen pro Probe jeweils nur an einem Locus vor. Die Wissenschaftler sahen zwei unterschiedliche Situationen: ein großes Allel neben zwei unterschiedlich großen kleineren -der häufigste Fall, andererseits und weniger häufig drei gleich große Allele. Sie erklären sich den ersten Fall mit einer somatischen Mutation an einem heterozygoten Locus (Siehe Abb. 5). Die Erklärung für den zweiten Fall könnte ein örtliches Duplikationsereignis in dem Bereich des Chromosoms sein, in dem der entsprechende Marker liegt. Die Duplikation eines ganzen Chromosoms halten die Autoren für unwahrscheinlich, da autosomale Trisomien oft nicht mit dem Überleben der Zygote vereinbar sind (Clayton et al. 2004).

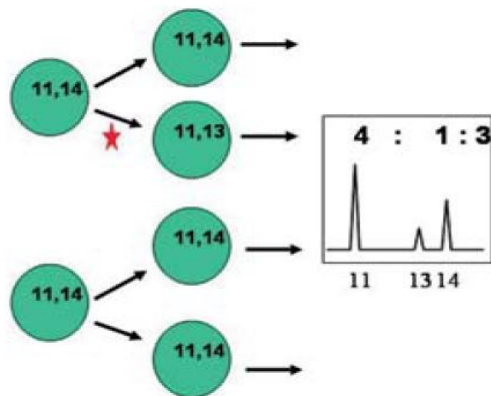


Abbildung 5: Eine mögliche Erklärung für drei Allele mit unterschiedlichen Peak-Höhen an einem heterozygoten Locus. Zwei Zellen vollziehen eine Teilung im Rahmen der Mitose. Bei einer der beiden Zellen kommt es zu einer Mutation (Stern). Das ursprüngliche Allel 14 verliert dabei eine Wiederholungseinheit (4bp), wodurch Allel 13 entsteht (Clayton et al. 2004).

Aber nun zurück in die Krebsforschung. Was LOH angeht, so findet sich dieser insbesondere im fortgeschrittenen Tumorstadium, und fast alle Tumorzelllinien stammen von Tumorzellen in einem solchen Stadium ab (Masters et al. 2001). Dementsprechend ist es auch bei den 14 auf LOH und MSI untersuchten HROC-Tumorzelllinien so, dass sie mehrheitlich von Tumoren stammen, die in der TNM-Klassifikation ein Stadium  $\geq T3$  aufweisen (sechs Tumoren im Stadium T4 (42,9%), fünf T3-Tumoren (35,7%), drei T2-Tumoren (21,4%)). Ein Beispiel für den Verlust der Heterozygotizität findet sich u.a. im Elektropherogramm der HROC57 Tumorzelllinie beim Marker TH01, TPOX und CSF1PO (Siehe Abb. 12, Anhang). Während sich bei den HROC57 B-Zellen an diesen Loci noch zwei Allele finden, weist die Tumorzelllinie dort jeweils nur noch ein Allel auf. Das zweite Allel an diesen Loci ist vollständig weggefallen. Wodurch entsteht LOH? Durch Deletionen, Genkonversionen, Non-Disjunktion bei der Mitose und die Rekombination zwischen zwei homologen oder nicht homologen Chromosomen (Tariq und Ghias 2016).

Nun könnte man denken, dass man beim Vergleich von Normalgewebe mit Tumorgewebe im Fall von LOH im Elektropherogramm an einem Locus beim Normalgewebe zwei Peaks sieht, und an demselben Locus beim Tumorgewebe schließlich das vollständige Fehlen des zweiten Peaks, also des zweiten Allels, beobachtet. Dem ist aber nicht so, und an dieser Stelle kommen wieder die unausgewogenen Peak-Höhen ins Spiel: Die Reduktion eines von zwei Allelen um mindestens 50% gilt beim Vergleich von Normalgewebe mit Tumorgewebe als LOH (Tomlinson et al. 2002), d.h. es muss beim Tumorgewebe an einem Locus schließlich nicht nur ein einziger Peak zu sehen sein, auch eine bis zu einem gewissen Grad ausgeprägte Peak-Höhen

Imbalance gilt als LOH. Man rechnet üblicherweise einen Quotienten aus und teilt dafür die PHR des Tumorgewebes ( $T1:T2$ ) durch die PHR des Normalgewebes ( $N1:N2$ ), wobei T1 und N1 jeweils die kleinere Peak-Höhe des Tumor- bzw. Normalgewebes an einem Locus meint. Ein Wert  $< 0,5$  gilt als LOH. Sollte das Ergebnis in einigen Fällen  $> 1$  sein, dann rechnet man  $1 / [(T1:T2)/(N1:N2)]$ . Loci, die bereits beim Normalgewebe homozygot sind, gelten als nicht informativ (Vauhkonen et al. 2004; Cawkwell et al. 1993). Früher hat man mitunter auch die Area-Angaben anstatt der Peak-Höhen verwendet, was heute aber unüblich ist. Es hat sich nämlich bei der Verwendung von Software, die Allele benennen kann, herausgestellt, dass Peak-Höhen reproduzierbarer sind als Area-Angaben. Auch Applied Biosystems als Hersteller von Kapillarelektrophoresen hat die Verwendung der Peak-Höhen zur Quantifizierung von PCR-Produkten empfohlen (Skotheim et al. 2001).

Man könnte sich nun fragen, warum von dem weggefallenen Allel dann aber eigentlich noch eine Spur zu sehen ist. Weil in frischen Tumorproben immer auch normale Zellen enthalten sind, die die Tumorprobe kontaminieren und im Elektropherogramm des Tumorgewebes für einen kleinen zweiten Peak sorgen können, an einem Locus, an dem es – ginge es allein nach den Tumorzellen- gar keinen zweiten Peak mehr gäbe (Tomlinson et al. 2002). Das Stichwort Kontamination des Tumors durch Normalgewebe kommt einem Betrachter beim Anblick der Elektropherogramme einiger HROCs in den Sinn, und zwar bei HROC87 (D5S818), HROC123 (D7S820) und HROC257 (D7S820). An den jeweiligen Loci finden sich neben zwei neuen “Tumor-Peaks” auch die ursprünglichen Peaks des Normalgewebes. Es wäre denkbar, dass sich in diesen Fällen ein besonders hoher Anteil von Normalgewebe in der Probe befunden hat. Es wäre aber auch denkbar, dass ein Subklon des Tumorgewebes unabhängig vom Normalgewebe genau diesen Genotyp aufweist, mit vier Allelen an den oben genannten Loci. Dazu passt, dass Tomlinson und Kollegen als Antwort auf die Frage, warum von einem wegfallenden Allel in so manchem Fall noch eine Spur zu sehen ist, auch die Heterogenität von Tumorgewebe anführen. Dazu schreibt Rajagopalan: „Die meisten Tumoren enthalten Zellen, die nicht nur eine abnormale Anzahl von Chromosomen enthalten (oft zwischen 60 und 90), sondern die sich auch untereinander unterscheiden, was die Anzahl von Chromosomen, die sie enthalten, angeht. Ferner weisen diese Chromosomen üblicherweise Veränderungen auf, die in normalen Zellen verschwindend gering sind: Inversionen, Deletionen, Duplikationen und Translokationen.“ (Rajagopalan und Lengauer 2004). Baisse et al. haben in einer Arbeit die genetische Heterogenität innerhalb von Tumoren aufgezeigt. Sie haben 15 sporadische, fortgeschrittene CRCs untersucht, und dabei von jedem Tumor mehrere Proben genommen. In fünf Tumoren wurde in allen Proben nur ein Genotyp gefunden. Andere Tumoren aber zeigten mindestens

fünf unterschiedliche Genotypen. In einer dreidimensionalen Rekonstruktion des Tumormaterials zeigte sich dann, dass es sich um topographisch unterschiedliche Zellpopulationen handelte. Die Autoren hielten fest, dass dies darauf hindeutet, dass im fortgeschrittenen CRC Subklone mit unterschiedlichen Genotypen nebeneinander existieren (Baisse et al. 2001).

Wenn Peak-Höhen Imbalance und LOH so zusammenhängen wie beschrieben, dann gilt eine Punktmutation an einer der Primer-Bindungsstellen an einem heterozygoten Locus und die damit einhergehende unterschiedlich effiziente Amplifikation in der PCR nicht nur als Ursache für eine ausgeprägte Peak-Höhen Imbalance, sondern auch für LOH (Vauhkonen et al. 2004). Beziehungsweise die Mutation an der Primer-Bindungsstelle zeigt sich im Elektropherogramm als LOH, sowie das auch für chromosomale Instabilität der Fall ist, für Aneuploidie oder für die bereits weiter oben aufgeführten chromosomalen Rearrangements, die die Ursache für LOH darstellen (Vauhkonen et al. 2004).

Zu den LOH-Fällen bei den HROC-Proben: Die Kriterien, nach denen beim Auszählen der LOH-Ereignisse vorgegangen wurde, wurden bereits im Kapitel Material und Methoden geschildert. Anders als bei Poetsch et al. 2004 wurde kein Unterschied zwischen partieller LOH – wenn einer der beiden Peaks nicht vollständig wegfällt, sondern sich noch teilweise darstellt – und LOH gemacht. Beide Fälle wurden unter LOH zusammengefasst. Bereits beim Normalgewebe homozygote Loci wurden als nicht informativ gewertet (Vauhkonen et al. 2004). Nach den Empfehlungen des NCI-Workshops heißt es, dass ein Locus entweder LOH oder MSI aufweisen sollte, nicht beides. Es wurden Empfehlungen für Loci gegeben, die LOH und MSI aufweisen, gleichzeitig wurde aber auch eingestanden, dass diese Empfehlungen noch weiterer Untersuchungen bedürfen (Boland et al. 1998). Nach den Empfehlungen des Workshops wurden Marker bei MSI-H Proben, die sowohl LOH als auch MSI aufwiesen, als nicht informativ für LOH gewertet. In Anlehnung an Vauhkonen et al. 2004 wurde wie bei den Beurteilungskriterien für MSI auch für LOH eine 30%-Regel angewandt: Zeigte eine Probe  $\geq 3$  veränderte Marker, so wurde sie als LOH-H angesehen. Eine geringere Anzahl veränderter Marker galt als LOH-L. Kein veränderter Marker bedeutete MSS.

Zunächst wurden 89 HROC Tumorproben auf LOH-Ereignisse untersucht (sporadische CRC-Fälle). Der LOH-Phänotyp findet sich bei 38 Tumorproben (42,7%), 38,2 % aller Tumorproben sind LOH-L (34 von 89) und 4,5 % der Tumorproben sind LOH-H (4 von 89 Proben).

Vauhkonen et al. kommen bei 41 untersuchten gastrointestinalen Tumoren, darunter 23 CRCs und 18 Magenkarzinomen, zwar auch in etwa auf die gleiche Probenanzahl mit LOH-Phänotyp

(48,8%), der Anteil der LOH-H Proben ist bei ihnen aber mit 22% aller Tumorproben deutlich höher, während sie 26,8 % aller Tumorproben als LOH-L einordnen. Ev. liegt die Ursache hierfür teils im unterschiedlichen Probengut, teils in der unterschiedlichen Probenanzahl begründet. An den LOH-Beurteilungskriterien dürfte es nicht liegen, da hier wie oben erwähnt Vauhkonen et al. als Orientierung dienten. Unterschiedliche Marker dürften hier auch keinen Unterschied machen, sofern die Anzahl der Tetranukleotid-Repeats ähnlich groß ist. Angaben zu LOH schwanken in der Literatur aber auch sehr. Das sieht man beispielsweise im Fall von LOH auf den Chromosomen 5q, 18q und 17p beim sporadischen CRC, wo sich die Angaben zwischen 17 und 75% bewegen (Lindfors et al. 2003).

Aber nun zurück zu den HROC-Proben. Bei 38,2 % aller Tumorproben handelt es sich um Non-MSI-Fälle mit LOH (34 Proben von 89), bei 49,4% um Non-MSI-Proben ohne LOH (44 von 89). Letztere sind sozusagen MSS-Proben nach LOH-Kriterien, die etwas weiter oben beschrieben wurden. Goel und Kollegen, die insgesamt 209 sporadische CRC-Fälle mit 11 Mikrosatelliten-Markern untersucht hatten (8 Dinukleotid-, 2 Mononukleotid und 1 Tetranukleotid-Marker), kommen hingegen auf 47,8% Non-MSI mit LOH und 37,8% Non-MSI ohne LOH (Goel et al. 2003). Die HROC-Daten irritieren an dieser Stelle etwas, ist es doch LOH, das Non-MSI Tumoren ausmacht. Bei der LOH-Analyse wurden nicht nur offensichtliche, sondern auch partielle LOH-Fälle bedacht, dieser Punkt dürfte also nicht ursächlich sein. Eventuell sind unter den HROC-Tumoren mehr Proben mit homozygoten Loci beim Normalgewebe, die ja als nicht informativ gelten. Dann kommen bei den entsprechenden Probenpaaren gleich weniger Loci für LOH in Frage. Eventuell weisen einige der HROC-Proben auch eine zu hohe Kontamination mit Normalgewebe auf. Aufgrund fehlender Angaben zum prozentualen Anteil normaler DNA in den HROC-Tumorproben wurde als Cut-Off bei den berechneten Allel-Ratios 0,5 gewählt. Bei diesem Wert, der meistens verwendet wird, geht man davon aus, dass max. 50% der DNA in einer Tumorprobe normale DNA ist (Tomlinson et al. 2002). Tomlinson et al. erwähnen auch, dass man, wenn man 10% Spielraum für Fehler einräumt, höchstens die Reduktion eines der beiden Tumor- Peaks um 40% - im Vergleich mit dem Normalgewebe - erlauben könnte. Wäre so vorgegangen worden, dann hätten sich mehr LOH-Fälle ergeben.

Wie bei Goel et al. 2003 wurde auch hier nach einem Überlappen der LOH- und MSI-Fälle geschaut. Die Wissenschaftler um Goel kommen auf insgesamt 107 Proben, die LOH-Ereignisse zeigen. 65,4% dieser Proben sind MSS, 28% MSI-L und 6,6 % MSI-H. Von den 38 HROC-Proben, die in dieser Arbeit LOH-Ereignisse aufweisen, sind 60,5% MSS (23 von 38), 28,9 %

MSI-L (11 von 38) und 10,5 % MSI-H (4 von 38). Man sieht, dass sich die Ergebnisse nicht stark unterscheiden. Auch zeigt sich bei den HROC's wie auch in der Arbeit von Goel et al., dass LOH häufiger bei MSI-L Tumoren vorkommt als bei MSI-H-Tumoren.

Wenn man die oben beschriebenen Zahlenwerte etwas zusammenfasst, dann sind von den 38 HROC-Proben, die LOH-Ereignisse aufweisen, 89,4% Non-MSI Proben und 10,5 % MSI-H Proben. Bei Poetsch et al. sind von 13 primären CRC-Proben mit LOH-Ereignissen 77% Non-MSI-Proben (10 von 13) und 23% MSI-H (3 von 13) (Poetsch et al. 2004). Allerdings ist die untersuchte Probenanzahl mit 22 CRC-Proben dort deutlich kleiner. Die Arbeitsgruppe verwendete für die Analyse von insgesamt 180 unterschiedlichen soliden Tumoren neun STR-Marker, darunter auch vWA, D5S818, D13S317 und D7S820. Von diesen vier Markern zeigen sich bei D5S818 und D13S317 die meisten LOH-Ereignisse, gefolgt von vWA und schließlich D7S820. Bei Vauhkonen et al. liegt, was die Anzahl der durch LOH veränderten Loci angeht, CSF1PO (9 von 77) vor D13S317 und vWA (beide 6 von 77), während D5S818 das Schlusslicht bildet (4 von 77). Die Autoren haben darüber hinaus noch zahlreiche weitere STR-Marker verwendet, die aber nicht im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden.

Bezüglich der 14 untersuchten HROC- Tumorzelllinien: Wenn sich ein LOH-Fall zeigt, dann wie auch bei den Tumorproben meist bei einem einzigen Marker. Die Marker mit den meisten LOH-Ereignissen lauten wie bei den Tumorproben D5S818, CSF1PO und D13S317. Bei den anderen Markern gibt es Unterschiede bei der Häufigkeit der LOH-Fälle, allerdings wurden bei den Tumorzelllinien auch deutlich weniger Proben untersucht. Sucht man nach LOH-Ereignissen bei Tumorzelllinien im Vergleich zum Tumormaterial, so wird man meist bei D5S818 und bei CSF1PO fündig. Diese Untersuchung bestätigt auch, dass sich das STR-Profil von Tumorzelllinien von dem des Originaltumors unterscheiden kann (Nims et al. 2010). Dass sich auch die STR-Profile von Tumor und PDX unterscheiden, zeigt sich anhand der LOH-Ereignisse bei den PDX-Proben. Untersucht wurden 34 Probenpaare (sporadische CRC-Fälle), und wie bei den anderen Probenpaaren auch findet sich LOH meist bei einem einzigen Marker, wenn sich denn LOH-Fälle finden. Die meisten Proben weisen nämlich kein LOH-Ereignis auf. Schließlich wurden noch 15 Probenpaare auf LOH bei den PDX-abgeleiteten Zelllinien im Vergleich zum PDX-Material geprüft. Hier zeigen sich die meisten Ereignisse bei D13S317, allerdings ist die untersuchte Probenzahl nicht groß.

Zu den STR-Profilen von HROC-Tumoren und ihren Metastasen: Auch hier zeigt sich an vier untersuchten Fällen, dass STR-Profile von Tumor und Metastase sich entsprechen können, es aber nicht müssen. So finden sich bei zwei der untersuchten Probenpaare Fälle von LOH bei

der Metastase. Die Beobachtung, dass Metastasen einen anderen Genotyp aufweisen können als der Primärtumor, haben auch Baisse et al. gemacht. Sie haben Lymphknotenmetastasen zu 14 sporadischen CRCs untersucht, und bei neun Metastasen einen dem Hauptklon des Tumors ähnlichen Genotyp gefunden. Bei fünf Metastasen unterschieden sich die Genotypen von Tumor und Metastase hingegen. Das ging in zwei Fällen so weit, dass die Genotypen überhaupt nicht übereinstimmten (Baisse et al. 2001).

Es wurden bisher nacheinander mehrere wichtige Punkte besprochen, zum Beispiel die Situation, dass sich in einem Elektropherogramm drei oder mehr Allele an einem Locus zeigen, oder unausgewogene Peak-Höhen. Als Erklärung wurde in einem Zitat die Trisomie angeführt, also Aneuploidie. Dazu passt auch das Stichwort chromosomale Instabilität. Diese Begriffe sollen nun zunächst in ihren Gesamtzusammenhang eingeordnet werden, bevor dann ausführlicher von MSI die Rede sein wird.

Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2015 stellt den besagten Gesamtzusammenhang dar. Hier wird erklärt, dass der Prozess der Tumorgenese beim CRC durch zwei Faktoren vorangetrieben wird: durch genomische Instabilität oder durch epigenetische Veränderungen. Unter Erstere fallen zwei Phänomene: MSI und die chromosomale Instabilität (CIN = chromosomal instability) (Laubert et al. 2015; Goel et al. 2003). Beim Stichwort epigenetische Veränderungen geht es um den CpG Island Methylator Phenotype (CIMP), auf den hier nicht näher eingegangen werden soll. Es ist nun so, dass CRCs durch einen dieser Faktoren entstehen, oder durch eine Kombination aus MSI, CIN und CIMP (Tariq und Ghias 2016). Diese Kombinationsmöglichkeiten leisten somit einen Beitrag zur inter-Tumor Heterogenität (Blanco-Calvo et al. 2015). Der CIMP Pathway geht oft mit MSI einher. Beide haben mit epigenetischen Veränderungen zu tun, weshalb Blanco-Calvo et al. auch nicht zwischen genomischer Instabilität auf der einen, und epigenetischen Veränderungen auf der anderen Seite unterscheiden. Aus ihrer Sicht gibt es die genomische Instabilität, die sich auf den drei Wegen CIN, MSI und CIMP abspielen kann.

Zusätzlich zu den genomischen und epigenetischen Eigenschaften wurden in den letzten Jahren anhand von Genexpressionsprofilen molekulare Subtypen des CRCs identifiziert. Dabei tauchen immer wieder drei unterschiedliche Subtypen auf: Erstens MSI immun-aktiviert, hypermutiert (viele BRAF-Mutationen) und CIMP-H; zweitens CIN mit Epithelial-proliferativen Eigenschaften, Hochregulierung des Wnt Pathway und CIMP negativ oder niedrig; drittens CIN mit Mesenchymal-invasivem, stromalen Phänotyp, angereichert mit Stammzellen (Dienstmann et al. 2014; Shen et al. 2007).



Was ist nun CIN? CIN ist kein Zustand, CIN ist eine Rate. Diese Rate ist bei Tumorzelllinien des CRC erhöht, sodass man CIN als erhöhte Rate von chromosomalen Verlusten oder Gewinnen bezeichnen kann, die schließlich zu Aneuploidie führt (Rajagopalan und Lengauer 2004). An dieser Stelle gehört übrigens auch LOH in den Gesamtzusammenhang eingeordnet. Was Rajagopalan aber auch betont ist, dass CIN eine mögliche Ursache der Aneuploidie ist, und dass es sich hier um eine Hypothese handelt. Aneuploidie jedenfalls ist häufig beim CRC und bei anderen Krebsarten (Lengauer et al. 1997), wie häufig ist nicht leicht zu sagen, in der Metaanalyse aus 2015 wird davon gesprochen, dass sich die Frequenz der Aneuploidie beim CRC zwischen 30 und 81% bewegt (Laubert et al. 2015). Soviel also zur Aneuploidie. Nun spielt bei ca. 15 % der CRCs aber eine andere Kategorie der genomischen Instabilität eine Rolle. Diese Tumoren sind nicht aneuploid, sondern oft diploid und zeigen MSI (Lengauer et al. 1997). MSI-Tumoren finden sich oft im proximalen Kolon, haben ein medulläres Wachstumsmuster und – wenn sie nicht wenig differenziert sind – eine muzinöse und/oder Siegelring-Differenzierung. Sie weisen seltener Fern- oder Lymphknotenmetastasen auf, typisch sind auch Tumor-infiltrierende Lymphozyten. Die Patienten sind meist weiblich und bei der Diagnose sporadischer Fälle im höheren Lebensalter. Auch sind MSI-Tumoren im frühen Stadium mit einer besseren Prognose verbunden als MSS-Tumoren, wobei dieser Aspekt für histologisch als high grade eingestufte Typen derzeit in Frage gestellt wird. Des Weiteren profitieren CRC-Patienten mit MSI-Tumoren im klinischen Stadium II eher nicht von einer Therapie mit 5-Fluorouracil (Kim et al. 2003; Dienstmann et al. 2014; Thibodeau et al. 1993; Shia 2015). Bei MSI-Tumoren finden sich ferner weniger LOH-Ereignisse und eine niedrigere Frequenz, was p53 Mutationen angeht (Halford et al. 2002). Und schließlich weisen sporadische MSI-Tumoren oft eine BRAF V600E Mutation auf, wobei sich noch nicht erklären lässt, warum dies so ist. Es gilt, dass sich in diesen Tumoren dann keine KRAS-Mutationen finden. Ungewöhnliche Fälle wurden beschrieben, wobei es sich um sporadische MSI-Tumoren mit KRAS, aber ohne BRAF-Mutation handelte (Zauber et al. 2015b).

Im hier untersuchten HROC-Probengut finden sich insgesamt dreizehn durch das MOI-Labor bestätigte MSI-Probenblöcke, und tatsächlich waren zehn der dreizehn MSI-Tumoren im Caecum oder Colon ascendens lokalisiert (77%). Der HROC123-Tumor hatte seine Lokalisation im Colon descendens, genauso wie der HROC171-Tumor, während der Tumor zu HROC186 im Rektum lokalisiert war.

#### 4.4 MSI

Bei MSI kommt es aufgrund der Deletion oder Insertion von Nukleotiden zu einer Längenveränderung an Mikrosatelliten-Allelen, meist in nicht kodierenden, aber auch in kodierenden DNA-Regionen. Diese Veränderungen gehen auf einen Defekt im DNA MMR-System zurück, der durch Mutationen entsteht, die MMR-Gene inaktivieren. Beim vererbten Krankheitsbild LS handelt es sich um Keimbahnmutationen, wobei eins der humanen MMR-Gene – MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 – inaktiviert wird. Es gibt auch den Fall, dass sich keine Keimbahnmutation im MSH2-Gen findet, wohl aber eine Keimbahndeletion im EPCAM-Gen. Diese führt dann dazu, dass MSH2 Allel-spezifisch inaktiviert wird. Die LS-Fälle machen ca. 3% der insgesamt 15% MSI-Fälle beim CRC aus. Die restlichen 12% sind sporadische CRC-Fälle. Bei Letzteren sind wohl auch MSI-Fälle mit biallelischen somatischen Mutationen in den MMR-Genen einzuordnen, die erstmals in 2013 beschrieben wurden, die allermeisten sporadischen CRCs kommen aber durch eine an beiden Allelen stattfindende Methylierung der Promotorsequenz des MLH1-Gens zustande. MLH1 ist also inaktiv bzw. wird ruhig gestellt – man spricht daher auch vom Epigenetic Silencing von MLH1. Die Folge ist das Ausbleiben einer ordnungsgemäßen Expression der MMR-Proteine, weshalb bei der DNA-Replikation entstehende Mismatches nicht mehr korrigiert werden können. Mutationen, sei es nun im Bereich von wichtigen Genen oder Mikrosatelliten außerhalb kodierender DNA-Regionen, können sich so in CRC-Zellen anhäufen (La Chapelle 2003; Tariq und Ghias 2016; Shia 2015). Und Mikrosatelliten sind aufgrund ihrer repetitiven Struktur prädestiniert für die sog. strand slippage, das Verrutschen der DNA-Polymerase während der DNA-Replikation (Hoang et al. 1997). Mit einer Frequenz zwischen 0,01 und 0,13 selten und meist sporadisch sind konstitutionelle MLH1-Epimutationen Ursache des LS. In diesen Fällen lässt sich kein MLH1-Protein im Tumor nachweisen, aber auch keine pathogene MLH1-Variante (Crucianelli et al. 2014). Es gibt laut Shia übrigens auch Patienten, deren Tumor zwar einen Defekt im MMR-System aufweist, bei denen sich aber weder eine MMR-Keimbahnmutation noch eine MLH1-Methylierung findet. Bei diesen Patienten spricht man vom Lynch-Like-Syndrom.

Abhängig von der Anzahl der von Instabilität betroffenen Loci macht man einen Unterschied zwischen MSI-high (MSI-H) und MSI-low (MSI-L). MSI-negative Zellen fallen unter Mikrosatellitenstabilität (MSS), wobei fünf STR-Marker ausreichen, um Proben entsprechend

zu klassifizieren: Findet sich bei mindestens zwei der fünf STR-Marker MSI, so gilt das als MSI-positives Ergebnis (Vauhkonen et al. 2004; La Chapelle 2003). In ihrer Arbeit aus 2004 ziehen Vauhkonen und Kollegen die Grenze zwischen MSI-H und MSI-L bei fünf STR-Loci: Finden sich neue Allele in  $\geq$  fünf von insgesamt 15 untersuchten STR-Loci, so gilt eine Probe als MSI-H, zeigen sich hingegen nur in ein bis vier STR-Loci neue Allele (also bei weniger als 30%), so gilt eine Probe als MSI-L. Hier stellt sich die Frage, woher die Idee kommt, als Grenze 30% der STR-Loci zu wählen. Ende 1997 fand in den USA ein vom National Cancer Institute (NCI) unterstützter Workshop statt, bei dem die MSI im Mittelpunkt stand. Es ging u.a. darum, die damals aktuelle Literatur zu MSI zu überblicken, sich auf eine gemeinsame Nomenklatur zu einigen und auf ein einheitliches Set von Markern, um eine bessere Vergleichbarkeit der Arbeiten, die sich mit MSI beschäftigen, zu erreichen. Die fünf Marker, die schließlich zur Untersuchung von MSI beim CRC ausgewählt wurden, waren BAT25 und BAT26 (mit Mononukleotiden als sich wiederholende Einheiten), D5S346, D2S123 und D17S250. Die letztgenannten drei Marker haben Dinukleotide als sich wiederholende Einheiten. Eine Instabilität in  $\geq$  zwei Markern gilt als MSI-H. Es wurde aber auch betont, dass es sich bei den fünf Markern sozusagen um eine gutgemeinte Empfehlung handelt, und die Auswahl von anderen Markern - wenn es dafür einen guten Grund gibt - nicht grundsätzlich als falsch angesehen wird. Sollte man eine größere Anzahl von Markern verwenden, dann sollte man die Prozentzahl an die jeweilige Markeranzahl anpassen, wobei die Grenze für MSI-H Tumoren bei MSI in  $\geq$  30-40% der getesteten Marker liegen sollte. Veränderungen in weniger Markern bedeutet MSI-L (Boland et al. 1998). Veränderungen in keinem Marker bedeuten wie bereits weiter oben beschrieben MSS, wobei sich MSI-L Tumoren von MSS-Tumoren sowohl unter klinischen, also auch unter pathologischen Gesichtspunkten kaum zu unterscheiden scheinen, und die Bedeutung der MSI-L Untergruppe noch zu klären ist (Umar et al. 2004; Halford et al. 2002).

Im Fall der im MOI-Labor verwendeten acht STR-Marker sollten MSI-H Tumore folglich in  $\geq$  drei Markern Veränderungen zeigen. Zu Beginn der Arbeit mit den HROC-Proben stand der MSI-Status der für das Labor wichtigsten Proben bereits fest, es ging also darum herauszufinden, ob die Elektropherogramm-gestützte Auswertung auf das gleiche Ergebnis kommen würde. Dies war der Fall. Alle vom Labor zuvor als MSI-H eingestuft Tumorproben, bei denen Normalgewebs- bzw. B-Zell/Tumorgewebs-Elektropherogramme vorliegen, zeigen Veränderungen in  $\geq$  drei STR-Markern. Auch die MSI Normalgewebs- bzw. B-Zell/Tumorzelllinien-Proben verhalten sich so. HROC123 schien anfangs ein Ausreißer zu sein, da sich hier nur offensichtliche Veränderungen bei zwei Markern zeigen, was daran liegt,

dass ein neues Allel bei D5S818 nicht die gewählte Vorgabe einer Peak-Höhen Ratio  $\geq 0,25$  erfüllt. Diese Vorgabe wurde in Anlehnung an Parson et al. 2005 gewählt, um sicher nur relevante Allele zu zählen, und nicht hoch geratene Stotter-Produkte oder sonstige Extrapeaks. Streng genommen haben Parson et al. diese Bedingung aber nur an Allele in Stotter-Position gestellt. Da sich der neue Peak bei HROC123 allerdings nicht in Stotter-Position befindet, ist der besagte Peak in diesem Fall relevant, womit die Probe letztendlich als MSI-positiv zu werten ist. Es stellt sich an dieser Stelle die Frage, ob es sinnvoll war, die Bedingung einer Peak-Höhen-Ratio von  $\geq 0,25$  an alle neuen Allele zu stellen. Ob es nicht auch gereicht hätte, für alle Allele jenseits der Stotter-Position die 15%-Stotter-Regel zu verwenden, so wie es Parson et al. letztendlich ja auch getan haben. Die Elektropherogramme von Tumorproben sind nicht selten konfus und weisen mehrere neue Allele pro Locus auf. Die Kriterien waren der Versuch, Irrelevantes sicher herauszufiltern. Auf Stotter-Produkte an sich wurde bereits weiter oben in der Diskussion eingegangen. Dass diese Stotter-Peaks auch höher sein können als üblicherweise, ist bekannt (Lygo et al. 1994). Lygo et al. schreiben auch, dass Hintergrundrauschen (engl. background noise) bei sehr hohen Peaks der Hauptallele höher ausfallen kann, und dass die Erfahrung der Person, die die Elektropherogramme auswertet, entscheidend ist. Es schien mir vor dem Hintergrund anfangs mangelnder Erfahrung im Umgang mit den Peaks vernünftig, stringente Kriterien für neue Allele zu wählen. Wir werden gleich sehen, dass die Ergebnisse für neue Allele bei den HROCs nur wenig von den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen abweichen. Das bestätigt mich darin, dass das gewählte Vorgehen vertretbar ist. Eine Rolle spielt sicher auch, dass viele neue Allele nun mal in Stotter-Position liegen, und auch, dass es für MSI-L keinen Unterschied macht, ob nun neue Allele in ein oder zwei Markern vorliegen.

Nun gibt es wie im Ergebnisteil erwähnt Proben, deren MSI-Status zu Beginn dieser Arbeit noch unbekannt war. Diese Proben wurden daher bei der Auszählung neuer Allele unter Non-MSI geführt. Bald stand aufgrund der Analyse aber fest, dass folgende Proben aufgrund der Anzahl der veränderten Loci MSI-H sein müssten: HROC146, 170, 171, 186, 251, 269 und 212. Dieser MSI-positive Status konnte durch das MOI-Labor inzwischen für HROC146, 170, 171, 186 und HROC212 bestätigt werden.

Von 89 HROC Tumorproben sind 12,4 % MSI-H (11 von 89). Dieser Wert stimmt mit Angaben in der Literatur überein, wonach beim sporadischen CRC 15% der Fälle MSI-H sind (Giardiello et al. 2001). Kim et al. kommen bei der Untersuchung von 137 sporadischen CRC Fällen auf 13% (18 von 137), wobei sie die Proben mit fünf Mikrosatelliten-Markern untersucht hatten

(Kim et al. 1994). Man sollte bedenken, dass die Studie wie viele Studien zu dem Thema vor 1997 entstanden ist, dem Jahr also, in dem man sich um einheitliche MSI-Kriterien bemühte.

Des Weiteren sind bei den HROCs 24,7 % MSI-L (22 von 89) und 62,9% MSS (56 von 89). 4,5% aller Tumorproben sind MSI-H mit LOH (vier Proben), 7,9% sind MSI-H und weisen kein LOH-Ereignis auf (7 Proben). Bei Goel et al. sind 14% der Proben MSI-H, 21% der Proben MSI-L und 65% gelten als MSS. Diese Zahlen entsprechen in etwa den HROC-Werten. Kambara et al. kommen bei der Analyse von 116 sporadischen fortgeschrittenen CRC-Fällen für MSI-H auf 6,9%, während 25,9% der Proben sich als MSI-L herausstellten und 67,2% als MSS (Kambara et al. 2001). Sie hatten mehrere Mikrosatellitenmarker verwendet, darunter das vom NCI empfohlene Marker-Set. Auch ihre Zahlen entsprechen den HROC-Ergebnissen. Vauhkonen et al kommen bei ihrer Analyse von 41 gastrointestinalen Tumoren, darunter 23 CRC und 18 Magenkarzinome, auf 12% MSI-H (5 von 41) und 29,3% MSI-L (Vauhkonen et al. 2004). Diese Ergebnisse passen – wenn auch das Probengut von Vauhkonen et al. nicht ausschließlich aus CRC-Proben besteht – zu den HROC-Ergebnissen. Die Autoren definieren MSS nicht nur als MSI-negativ, sondern auch als LOH-negativ und kommen hierfür auf 32% (13 von 41). Bei den HROCs ergeben sich für Non-MSI ohne LOH hingegen 49% (44 von 89). Hier weichen die Ergebnisse ab.

Noch ein Aspekt zu dem Set von fünf MSI-Markern: Wenn man sich fragt, worin die Bedeutung von STRs für das CRC liegt, dann geht es nicht nur darum, dass wie in dieser Arbeit mittels STR basierter Genotypisierung die Vertauschung von Proben verhindert bzw. aufgedeckt werden soll, damit Forschung an verlässlichen Tumormodellen möglich ist. STRs – wenn auch keine Tetrarepeats – finden darüber hinaus Verwendung bei der Testung auf MSI im Rahmen des LS-Screenings. Hierbei gibt es zwei von vielen Richtlinien empfohlene Vorgehensweisen: Beim universellen Ansatz wird jeder CRC-Patient einem LS-Screening unterzogen. Der Vorteil besteht darin, dass alle LS-Patienten erfasst werden, nachteilig sind hohe Kosten. Die Alternative stellt ein selektives Vorgehen dar, das mit niedrigeren Kosten verbunden ist, bei dem aber mehr als 25% der LS-Patienten nicht erfasst werden (Gelsomino et al. 2016). Die selektive Vorgehensweise läuft zusammengefasst wie folgt ab: Mittels MMR-Immunhistochemie – als am effektivsten wird derzeit ein Panel aus zwei Antikörpern für MSH6- und PMS2-Proteine angesehen – oder eines MSI-Tests soll die Frage geklärt werden, ob bei einem Patienten mit Verdacht auf LS die Indikation für einen Test auf Keimbahnmutationen gestellt werden sollte. Kommt es bei der Untersuchung des Tumorgewebes zu einem unauffälligen Ergebnis, spricht es laut dem MSI-Test oder der

Immunhistochemie keinen Hinweis auf einen MMR-Defekt, so sollte einem Algorithmus nach nicht weiter nach pathogenen Keimbahnmutationen in den MMR-Genen gesucht werden. Bei einem auffälligen Ergebnis hingegen schon, wobei das genaue weitere Vorgehen davon abhängt, welches MMR-Gen betroffen ist (Shia 2015; Yuan et al. 2015; Steinke et al. 2014). Es stellt sich nun noch die Frage, bei welchen Patienten der Verdacht auf LS besteht. Aktuelle Empfehlungen des NCCN (National Comprehensive Cancer Network) zufolge sollte nicht nur bei Patienten, die die modifizierten Bethesda-Kriterien erfüllen nach LS gesucht werden, sondern auch bei CRC-Patienten, die 70 Jahre oder jünger sind, und bei Patienten mit CRC im Stadium II (Lin et al. 2015).

Im Rahmen der modifizierten Bethesda-Kriterien wurden auch zusätzliche Empfehlungen für die Arbeit mit dem fünf-Marker Panel herausgegeben. Man hatte in der Zwischenzeit gefunden, dass aufgrund der drei Dinukleotid-Repeats – sie sind weniger sensitiv als Mononukleotide – die Anzahl der MSI-H Tumore unterschätzt, und aufgrund der zwei Mononukleotid-Repeats die Anzahl der MSI-L-Tumore überschätzt werden könnte (Umar et al. 2004). Nun wurde im Rahmen einer Arbeit der MSI-Status von 134 CRCs und 26 Kolonkarzinom-Zelllinien erhoben. Es wurden 32 Mikrosatelliten-Loci (mit CA-Wiederholungen) mittels PCR untersucht, um dadurch überprüfen zu können, ob allein mit dem Marker BAT26 – einer Wiederholung von 26 Desoxyadenosinen in einem Intron des humanen MMR-Gens MSH2 – das gleiche Ergebnis gefunden werden konnte. Und tatsächlich kam man bei 159 der insgesamt 160 Fälle den MSI-Status betreffend auf ein identisches Ergebnis. Die Effizienz dieser Untersuchung lag also bei 99,4% (Hoang et al. 1997). Den MSI-Status allerdings nur mit BAT26 zu bestimmen gilt nicht als State of the Art. Standard ist der MSI-Test mit den fünf Markern. Es gab übrigens Wissenschaftler, die BAT26 sogar im Patientenstuhl bestimmt haben, um das proximale CRC nichtinvasiv nachzuweisen. Die Spezifität dieses Tests war mit 100% sehr gut, leider lag die Sensitivität bei CRC-Patienten mit proximalen Läsionen bei nur 37% (Traverso et al. 2002).

Im NCI-Workshop wurde empfohlen, bei der Bestimmung des MSI-Status immer Normalgewebe/Tumor-Paare zu untersuchen (Boland et al. 1998). Dass dieses Vorgehen sinnvoll ist, zeigt sich in einer Arbeit von Pyatt et al., die bei der MSI-Testung von Endometrium-Karzinomen mit BAT26 auf eine Probe stießen, die sowohl beim Normalgewebe als auch beim Tumormaterial Veränderungen aufwies. Nachdem sich herausgestellt hatte, dass die Probe von einem Afroamerikanischen Individuum stammte, untersuchten die Wissenschaftler u.a. normale DNA von 103 gesunden Afroamerikanern und fanden bei 12,6% einen Polymorphismus bei BAT26. Würde man bei diesen Individuen Proben auf MSI

untersuchen, ohne das Normalgewebe ebenfalls zu analysieren, so würde man fälschlicherweise MSI finden (Pyatt et al. 1999).

Nun aber zurück zu MSI-Fällen bei den HROC-Proben: Zieht man, wie es auch Parson et al. 2005 gemacht haben, die Mutationsraten der STR-Marker hinzu, die im Zuge von Vaterschaftstests ermittelt wurden (<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/mutation.htm>), so ergibt sich folgendes Bild (\* = Mutationsrate in %):

STR-Marker	VWA	CSF1PO	D13S317	D5S818	D16S539	D7S820	TH01	TPOX
*	0,17	0,16	0,14	0,11	0,11	0,1	0,01	0,01

Zur Erinnerung die Marker-Reihenfolge, die sich bei der Untersuchung der 89 HROC Normalgewebs- bzw. B-Zell/Originaltumor-Paare auf zusätzliche Allele beim Tumormaterial ergibt: VWA= CSF1PO> D13S317 >D7S820 > D16S539 >D5S818> TPOX > TH01.

Man sieht, dass die Marker, die am häufigsten Keimbahnmutationen zeigen, auch vorne liegen, was die Häufigkeit neuer Allele beim Tumorgewebe angeht. Man sieht auch, dass TPOX und TH01 “stabile“ Marker sind, bei denen Mutationen vergleichsweise selten sind. Diese Beobachtung wird nicht nur von Parson et al. in ihrer Arbeit aus 2005, sondern auch bei Vauhkonen et al. 2004 beschrieben.

Wenn sich neue Allele zeigen, dann handelt es sich um einen Zugewinn oder Verlust von einer oder mehreren Repeat-Units, ein Phänomen, das Clayton et al. ebenfalls beobachtet haben, als sie 342 Tri-allelic-Patterns untersuchten (Clayton et al. 2004). Bei den HROC-Tumorproben kommen mehrheitlich Basenpaare hinzu, meist eine Repeat Unit (83%, es wurden auch Fälle von mehreren neuen Allelen an einem Locus gezählt). Dies wurde so auch von Clayton und Kollegen, aber auch von Hoff-Olsen et al. gefunden (Hoff-Olsen et al. 1998). Letztere sahen bei 73% der Mutationsereignisse, bei denen nur ein neues Allel entstand, einen Zugewinn von einer Repeat-Unit, während zwei und drei Repeat-Units in jeweils 14% der Fälle hinzukamen. Auch bei den weiteren untersuchten HROC-Materialien handelt es sich, wenn sich Veränderungen zeigen, mehrheitlich um eine Veränderung um eine Repeat-Unit: 81,5% bei den Tumorzelllinien (14 untersuchte Normalgewebs- bzw. B-Zell/Tumorzelllinien-Paare), 85,3 % beim Vergleich von 34 PDX-/ Originaltumor-Paaren. Beim Vergleich von acht HROC-Tumorzelllinie/Originaltumor-Paaren finden sich nur drei Veränderungen bei den Tumorzelllinien, alle jeweils um eine Repeat-Unit. Genauso verhält es sich bei 15 untersuchten PDX-abgeleitete Zelllinie-/PDX-Paaren. Dazu passt, was Hoff-Olsen et al. ferner beschreiben,

nämlich dass die neuen Allele nahezu alle auf der Allel-Leiter zu finden sind. So verhält es sich auch bei den neuen HROC-Allelen.

Anders als bei Poetsch et al. 2004 wurde bei der Beurteilung des Repeat-Zugewinns bzw. Verlustes bei neuen Allelen kein Unterschied gemacht zwischen dem Auftauchen eines neuen, zusätzlichen Allels und der Verschiebung (Shift) eines mutierenden Allels. Im Vordergrund stand das Ziel, die Anzahl der mutierten Loci zu bestimmen. An zweiter Stelle ging es darum, wie bei Hoff-Olsen et al. 1998 Tendenzen auszumachen. Hoff-Olsen und Kollegen haben bei ihrer Untersuchung von 217 CRCs mit vier STR-Markern nämlich auch gesehen, dass einige Marker bei neuen Allelen eine Präferenz für einen Zugewinn oder Verlust an Repeats zeigen. vWA neigt laut den Autoren zur Expansion bei neuen Allelen, was zu den Ergebnissen dieser Arbeit passt. vWA zeigt sowohl bei neuen HROC Tumor-Allelen, als auch bei neuen Allelen bei der HROC-Tumorzelllinie eine Präferenz für einen Repeat-Zugewinn. Das gleiche gilt für neue Allele beim PDX im Vergleich zum Tumormaterial. TPOX hingegen zeigt bei neuen Allelen bei der HROC-Tumorzelllinie und beim PDX (im Vergleich zum Tumor) eine Präferenz für einen Repeat-Verlust.

Zu den STR-Profilen von HROC-Tumorzelllinien unterschiedlicher Passagen: HROC-Tumorzelllinien unterschiedlicher Passagen können, müssen aber nicht gleiche STR-Profile aufweisen. Bei einer von drei HROCs, für die DNA von zwei unterschiedlichen Tumorzelllinien-Passagen vorlag, zeigen sich bei der höheren Passage (HROC32 P42 im Vergleich zu HROC32 P11) neue Allele in zwei Markern. Diese Beobachtung passt zu einem bereits weiter oben in dieser Diskussion erwähnten Zitat, demnach Tumorzelllinien während der Kultivierung eine Allel-Kopie verlieren oder seltener hinzugewinnen können (Masters und Mitglieder der Arbeitsgruppe ASN-0002 der ATCC SDO 2010). Auch Parson et al. fanden beim STR-Profiling von vier Leukämie-Zelllinien nach einiger Zeit bei zwei Tumorzelllinien einen veränderten Fingerprint. Sie hatten die Zelllinien ein Jahr lang kultiviert und in monatlichen Abständen eine Genotypisierung vorgenommen (Parson et al. 2005). Die Autoren begründen das Verschwinden von Allelen, aber auch das Auftauchen neuer Allele bei Tumorzelllinien mit Veränderungen bei den Klonotypen, wobei sich die Zellen mit den neuen Allelen letztendlich gegen den Klon, aus dem sie ursprünglich hervorgegangen sind, durchsetzen.



### **MSI bei weiteren Tumorentitäten**

MSI kommt nicht nur beim CRC vor. Auch für Tumorentitäten, die sich neben dem CRC bei LS-Patienten finden, also Ovarial-Karzinom, Endometrium- und Magenkarzinom, sind nicht wenige MSI-Fälle beschrieben worden (Peltomäki et al. 1993). Welche Tumorentitäten grundsätzlich als LS-assoziiert gelten, hängt von den Kriterien ab, die man anlegt. Nach den Amsterdam II Kriterien sind es lediglich Endometrium-Karzinom (EC), Dünndarmkarzinom und Ureter- oder Nierenbeckenkarzinom. In den eher für die Klinik gedachten modifizierten Bethesda-Leitlinien von 2004 werden zusätzlich u.a. Magenkarzinom, Ovarialkarzinom, Pankreaskarzinom und Hirntumoren - üblicherweise Glioblastome im Rahmen des Turcot Syndroms - genannt (Vasen et al. 1999; Umar et al. 2004).

In einer Arbeit aus 1993 wurde auch ein LS Ovarial-Karzinom auf MSI untersucht. Das besagte Karzinom zeigte Veränderungen in sechs von sieben STR-Markern, sprich in mindestens zwei der sieben Marker, und konnte somit als MSI positiv angesehen werden (Aaltonen et al. 1993). In der Literatur bewegen sich die Angaben für MSI beim sporadischen Ovarialkarzinom zwischen 10 und 17%, bzw. zwischen 30 und 50%, wenn man nur die endometrioiden Ovarialkarzinome betrachtet, die ca. 15 bis 25% der Ovarialkarzinome ausmachen (Shannon et al. 2003). In einer weiteren Arbeit aus den 90er Jahren wurden 36 ECs untersucht, sporadische Fälle und Fälle in unabhängigen LS-Familien. MSI zeigte sich bei 75% der LS assoziierten Karzinome, aber auch bei 17% der sporadischen ECs (Risinger et al. 1993). Es kam in allen Fällen zu Veränderungen in mehreren Markern. Die Arbeitsgruppe um Peltomäki fand MSI bei vier von 18 untersuchten ECs (22%,  $\geq 2$  veränderte Marker von insgesamt sieben). Eine Untersuchung jüngerer Datums von 197 ECs mit dem 5-Marker Panel des NCI-Workshops ergab mit 22,8 % MSI-Fällen (45 von 197) ein sehr ähnliches Ergebnis; die restlichen 152 Fälle waren MSS (77,2%), wobei keine Informationen zu möglichen Tumorfällen in der Familie der Patienten vorlagen (Zauber et al. 2015a). Die geschilderten Ergebnisse für MSI passen zu Angaben in der Literatur, wonach MSI in 15-20% sporadischer ECs vorkommt (Steinke et al. 2014). Bezüglich MSI bei Karzinomen des oberen Gastrointestinal-Traktes wurden von Peltomäki und Kollegen in sechs von 33 untersuchten Magenkarzinomen, also in 18% der Fälle, MSI gefunden. Dazu passend kam eine andere Arbeitsgruppe auf MSI in 11 von 46 untersuchten Magen-Karzinomen (24%) (Keller et al. 1995). Zu den 11 Magenkarzinomen: 9 Tumoren zeigten Veränderungen in nur einem, zwei in mehr als der Hälfte der Marker. Man würde die neun Tumoren nach den Beschlüssen des oben

erwähnten NCI-Workshops nicht als MSI-H einordnen, allerdings handelt es sich hier nicht um CRC-Fälle – streng genommen gelten die Beschlüsse des Workshops nur für Letztere. Das NCI 5-Marker Panel gilt übrigens aber nicht nur als sensitiv und spezifisch für die Suche nach MSI-H beim CRC, sondern auch beim EC und beim Magenkarzinom (Williams und Huang 2013). Zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppen um Peltomäki und Keller lässt sich sagen, dass diese sich mit Angaben in der Literatur decken, wonach MSI bei 8-39% aller Magenkarzinome vorkommt und mit Eigenschaften verbunden ist wie einem hohen Patientenalter, Lokalisation im Antrum, einem intestinalen Typ nach Lauren und hohem Uptake in der PET-Bildgebung mittels 18F-FDG (18 F-Fluordesoxyglukose) (Kim et al. 2016). Kim und Kollegen kamen bei der Erhebung des MSI-Status von 434 Magenkarzinomen mittels des 5-Marker Panels auf 41 MSI-H Tumoren (9,4 %). Bei den Patienten gab es keinen Anhalt für LS oder FAP.

Wie sieht es beim Pankreaskarzinom aus? In dieser Arbeit wurden vier Normal- bzw. B-Zell/Tumorgewebe-Paare untersucht, und dabei kein Fall von MSI entdeckt. Ghimenti et al. haben bei der Analyse von 21 sporadischen Pankreas-Tumoren mit 10 Dinukleotid-Markern in 66% der Proben (14 von 21) für MSI typische Kontraktionen und Expansionen bei der Anzahl der Mikrosatelliten-Repeats gefunden (Ghimenti et al. 1999). Von den besagten 14 Proben zeigten 86% Veränderungen an nur einem Locus. Han und Kollegen untersuchten neun sporadische Pankreaskarzinome mit vier Dinukleotid-Markern und fanden MSI in sechs von neun Tumoren (67%). Sie zählten Proben als MSI positiv, wenn diese mindestens einen veränderten Locus aufwiesen (Han et al. 1993). Und Brentnall et al. schließlich fanden bei der Untersuchung von DNA aus Paraffin-Blöcken MSI an einem Locus bei 75% der untersuchten Pankreaskarzinom-Fälle (6 von 8), und an zwei oder mehr Loci bei 50% (4 von 8). Sie hatten 12 Dinukleotid-Marker verwendet (Brentnall et al. 1995). Die drei letztgenannten Arbeiten sind in den 90er Jahren entstanden, und es gilt, dass man neue Allele an nur einem Dinukleotid-Marker heute nicht mehr als MSI positiv ansehen würde. Auch beim CRC ist der Umgang mit Studien, die vor 1997 entstanden sind, bekanntlich schwierig, da die berichteten MSI-Frequenzen aufgrund von unterschiedlichen Markern und unterschiedlichen Ansichten, ab wann eine Probe als MSI-positiv gezählt werden sollte, stark abweichen (Dietmaier et al. 1997). In einem Review jüngerer Datums wird erwähnt, dass Yamamoto und Kollegen in 2001 mit Hilfe des NCI 5-Marker Panels 100 sporadische und drei LS – assoziierte Pankreaskarzinome untersucht haben. Unter den sporadischen Fällen fanden sie 13% MSI-H Tumoren, die drei LS-assozierten Fälle waren alle MSI-H. Und auch Laghi et al. haben in 2012 den MSI-Status von 338 Pankreaskarzinomen erhoben (duktale Adenokarzinome). In ihrer Arbeit, in der sie mit den fünf Mononukleotiden BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 und NR-27 arbeiteten, haben sie laut

Williams und Huang die größte Serie an Pankreaskarzinomen untersucht, die sich in der Literatur findet, und auch sie stießen nur auf einen MSI-H Tumor (0,3%), wenngleich es sein könnte, dass dem Panel eventuell einige MSI-Fälle entgangen sind. Williams und Huang schreiben zusammenfassend, dass die Prävalenz von MSI-H beim Pankreaskarzinom generell niedrig zu sein scheint (Williams und Huang 2013). Es muss also nicht sein, dass sich bei den HROP-Proben MSI-Fälle gefunden hätten, wenn die untersuchte Pankreaskarzinom-Probenanzahl in dieser Arbeit höher gewesen wäre.

Nun zu einer weiteren Tumorentität. In dieser Arbeit wurden nämlich auch einige wenige Glioblastom-Proben untersucht. Zunächst könnte man sich fragen, ob es überhaupt einen Zusammenhang zwischen dem CRC und Glioblastomen gibt. Den gibt es tatsächlich, dann nämlich, wenn eine atypische Polyposis Coli mit Glioblastomen im Rahmen des Turcot Syndroms zusammen auftritt. Diese genetische Erkrankung ist aber sehr selten (Tops et al. 1992). In dieser Arbeit wurden fünf sporadische Glioblastome analysiert, wobei die STR-Profile der Tumorzelllinien mit denen der jeweiligen B-Zellen verglichen wurden. Unter den fünf HROG-Probenpaaren fand sich kein MSI- Fall. Nun ist die untersuchte Probenanzahl mit fünf Tumorzelllinien/B-Zell-Paaren äußerst gering. Das Ergebnis passt aber zu den Ergebnissen von Alonso et al., die weitaus mehr Proben mit BAT-25 und BAT-26 auf den MSI-Status hin untersuchten, und zwar 102 Kinder- und 104 Erwachsenen-ZNS-Tumoren (Alonso et al. 2001). Darunter waren 165 astrozytäre Tumoren, von denen 7% MSI zeigten (12 von 165). Warf man bei den astrozytären Tumoren einen Blick auf die hochgradigen Fälle mit MSI, so stammten diese allerdings ausschließlich von Kindern (27%, 12 von 45), nicht von Erwachsenen. Wenn man die Angaben aus mehreren Studien zusammenzieht, dann kommt laut Alonso et al. MSI bei ca. 2 % der astrozytären Tumoren bei Erwachsenen vor. Eine Untersuchung von 129 sporadischen Glioblastom-Fällen mit 15 polymorphen Repeats, die vom NCI-Workshop empfohlen wurden – darunter auch das 5-Marker Panel – ergab ebenfalls, dass MSI beim Glioblastom selten ist. So fand die Arbeitsgruppe um Martinez keinen MSI-H-Fall und 11 MSI-L-Fälle, davon 6 bei neu diagnostizierten Glioblastomen und fünf bei Rezidiven. Die Autoren schreiben, dass die Dinukleotide die sensitivsten Marker waren, während kein Mononukleotid-Marker Veränderungen zeigte (Martinez et al. 2004).

Bezüglich Tumorentitäten, die nicht mit dem LS assoziiert sind: Peltomäki et al. fanden bei der Untersuchung von 85 Nichtkleinzelligen-Lungenkarzinomen keinen MSI-Fall. Bei Martinez und Kollegen wird nebenbei für das Nichtkleinzellige-Lungenkarzinom eine Frequenz von 35% beschrieben. Lothe et al. konnten bei ihrer Untersuchung von 84 Brustkrebs- und 86

Hodentumor-Fällen mit sieben STR-Markern auch keinen MSI-Fall entdecken (Lothe et al. 1993). Ferner stießen Orlandi et al. bei der Untersuchung von Tumor-/Normalgewebeproben von 40 Brustkrebs-Patientinnen auf keinen MSI-Fall. Sie hatten sieben STRs mit Tetranukleotid- und einen Locus mit Pentanukleotid-Repeats analysiert (Orlandi et al. 2002). Eine andere Arbeitsgruppe hingegen untersuchte 104 Brustkrebsfälle mit mehreren Dinukleotid-MSI-Markern und jeweils drei Tri- und Tetranukleotid – Markern, und stieß auf 11 MSI-Fälle (10,6%), wobei sich die meisten neuen Allele bei den Markern mit Trinukleotid-Repeats zeigten (Wooster et al. 1994). In ihrer Arbeit aus 2002 berichten Orlandi und Kollegen auch davon, wie weit die Ergebnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen bezüglich MSI bei Brustkrebs divergieren. Die Autoren erklären, dass in der Literatur als mögliche Ursache entweder die Heterogenität der verwendeten Marker oder das irrtümliche Mitzählen von PCR-Artefakten zu finden ist und betonen, hinsichtlich Letzterem äußerst achtsam gewesen zu sein. Auch können sie Argumente anführen, die dagegen sprechen, dass ev. die Verwendung von in Paraffin eingebetteten Tumormaterial anstatt frisch gefrorenem Tumormaterial ein Problem sein könnte. Um den Verdacht auszusräumen, die verwendeten Marker wären ev. nicht ausreichend sensitiv, prüften sie ihre Ergebnisse auch mit BAT-26. In Tabelle 26 (Anhang) sieht man, dass MSI bei sporadischem Brustkrebs eine Inzidenz von weniger als 10% hat.

Schließlich wurden noch drei Leberkarzinom/Normalgewebs-Paare analysiert, und dabei kein MSI-Fall festgestellt, wobei die Probenanzahl hier ähnlich wie bei den HRO-Pankreaskarzinom-Fällen sehr klein ist. Es liegen keine näheren Angaben zu diesem Probengut vor. In der Literatur gehen die Angaben zur Inzidenz von MSI beim HCC weit auseinander (Chiappini et al. 2004). Veränderungen an Mikrosatelliten wurden grundsätzlich aber schon oft beschrieben, laut Chiappini et al. basieren diese Arbeiten aber nicht selten auf HCC-Proben von Patienten mit Leberfibrose oder Leberzirrhose, wobei letztere wahrscheinlich auch einen Einfluss auf das Phänomen MSI hat. Daher haben die Autoren 37 HCC-Fälle untersucht, bei denen sowohl keine Leberzirrhose vorlag, als auch keine bekannten ätiologischen Faktoren wie hoher Alkoholkonsum, HBV oder HCV-Infektion. Chiappini und Kollegen fanden in diesem Probengut 16% MSI-H (6 von 37), 27 % MSI-L (10 von 37) und 57% MSS (21 von 37). Sie hatten die Proben mit mehreren Markern untersucht, darunter das NCI-Marker-Set. In einer anderen Arbeit wurden 60 HCC-Fälle von chinesischen Patienten untersucht und dabei viele LOH-Fälle gefunden, aber nur sehr selten MSI (0,19 % von 11.416 untersuchten Genotyp-Paaren). Die Autoren bestätigen, dass Studien zu MSI beim HCC äußerst unterschiedliche Ergebnisse zeigen (Wang et al. 2001).

### 4.5 Zu den Ergebnissen der Geschlechtsbestimmung

Zunächst einmal zur Sensitivität des Geschlechtsmarkers Amelogenin. Diesbezüglich wurde schon vor mehr als 20 Jahren gefunden, dass es sich bei der Geschlechtsbestimmung mittels Amelogenin um ein äußerst sensitives Analyseverfahren handelt. In einer Arbeit konnten Blut, degradiertes Muskelgewebe und Knochenproben mit nur 20 pg Proben-DNA analysiert werden (Mannucci et al. 1994).

Nun zu der Frage, was die Ursache für die beobachtete “Geschlechtsveränderung des Probenmaterials“ ist. Die Veränderung findet stets von männlich zu weiblich statt, was nahelegt, dass sich eine Veränderung auf dem Y-Chromosom ergeben hat, aufgrund derer am dortigen Locus kein Amplikon mehr entstehen kann. Und tatsächlich gibt es eine Arbeit aus dem Jahr 1998, in der das gleiche Phänomen beschrieben wird, nämlich das scheinbare Abhandenkommen der Y-Kopie des Amelogenin-Gens (AMELY). Als Ursache vermuten die Autoren, dass eine homologe Rekombination zwischen zwei Loci stattgefunden hat, nämlich zwischen TSPYA und TSPYB. Diese beiden Loci liegen auf dem Y-Chromosom eng beieinander und umgeben AMELY. Durch eine Rekombination könnte die Region zwischen beiden wegfallen, und somit auch AMELY. Diese Erklärung ist den Autoren nach wahrscheinlicher als ein Polymorphismus an einer der Primer-Bindungsstellen (Santos et al. 1998). Die Frequenz der Deletion im Probengut der Untersucher (350 Proben aus der ganzen Welt) betrug 0,6%. Es handelte sich um 2 Männer aus Sri Lanka. In Österreich wurden Proben von 29.432 männlichen Individuen (Kaukasier) auf eine Y-Kopie des Amelogenin-Gens hin untersucht und dabei bei sechs Individuen ein Fehlen dieser Kopie gefunden. Die Amplifikation von acht weiteren Y-chromosomalen Markern gelang bei fünf dieser sechs Individuen, die Amplifikation von SRY bei allen sechs. Die Untersucher entwarfen extra Primer, die den Bereich der üblichen Bindungsstellen der Amelogenin-Primer mit einschlossen, um sagen zu können, dass es sich tatsächlich um eine Deletion in der Amelogenin-Region handelte, und nicht um eine Mutation an der Primer-Bindungsstelle. Letzteres war nicht der Fall, da auch mit den alternativen Primern das Y-spezifische PCR-Produkt fehlte (Steinlechner et al. 2002). Die Frequenz des “falschen Y-Tests“ lag bei 0,018%.

Ferner hat sich in Australien eine Arbeitsgruppe um R. J. Mitchell mit Amelogenin-Gen negativen Männern beschäftigt und gefunden, dass die Frequenz des “falschen Y-Tests“ hier bei 0,02% lag. Es wurden 109.000 Proben untersucht und dabei 22 AMELY negative Proben

gefunden. Fünf dieser Proben hat die Arbeitsgruppe genauer untersucht. Es sollte die Größe der Deletion festgestellt werden, indem die Proben mit DNA-Markern für die Region um den Amelogenin-Locus herum analysiert wurden. So wurden 8 Orte auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms untersucht. Außerdem wurden 11 Y-spezifische Mikrosatelliten bestimmt, um über die Haplotypen etwas über die evolutionären Verwandtschaftsverhältnisse der Individuen aussagen zu können. Letztendlich konnten zwei unterschiedlich große Deletionen gefunden werden, eine mit einer Größe zwischen 304 und 731 kbp (in zwei Proben), die andere zwischen 712 und 1001 kbp (in drei Proben). Die kleinere Deletion könnte - das ergab die Haplotyp-Bestimmung - identisch sein, die größere ist es aber nicht. Die Autoren verglichen ihre Ergebnisse mit denen anderer Autoren und kamen zu dem Schluss, dass die AMELY Deletion entweder auf ein sehr altes Ereignis zurückgehen müsste, oder – was wahrscheinlicher ist- dass diese Mutation ganz oft auf jedem Kontinent vorkam (Mitchell et al. 2006). Wie Santos et al gehen die Autoren davon aus, dass zumindest die meisten der AMELY- Deletionen durch homologen Rekombination entstanden sind. Außerdem werden diese Veränderungen wohl vererbt, es handelt es sich nicht um *de novo* Mutationen.

An dieser Stelle wird es nun im Hinblick auf das in dieser Arbeit untersuchte Probengut interessant. Bisher wurde gesehen, dass es normalerweise sehr selten vorkommt, dass die Geschlechtsbestimmung mittels Amelogenin bei männlichen Individuen ein falsches Ergebnis liefert. Krebszellen weichen aber von der Norm ab, und *de novo* Mutationen sind hier keine Seltenheit. Betrachtet man alle 117 HROC-Probenblöcke – ein Probenblock besteht aus mindestens zwei Proben - so findet sich in 7,7% dieser Probenblöcke eine Änderung des Amelogenin-Genotyps, wobei der Amelogenin-Genotyp des Normalgewebes bzw. der B-Zellen - mit Ausnahme der einzeln vorliegenden Probe HROC135, für die diesbezüglich keine Angabe gemacht werden kann - mit dem tatsächlichen Patientengeschlecht übereinstimmt, während sich bei den weiteren Proben des Probenblocks aber eine Änderung zeigt. Auf die einzelnen Proben bezogen: Der Amelogenin-Genotyp stimmt bei 18 Proben (5%) nicht mit dem Patientengeschlecht überein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass bei Darmkrebszellen Veränderungen im Amelogenin-Genotyp häufiger sind als bei normalen Zellen, die in der Regel in der Forensik untersucht werden. Eine finnische Arbeitsgruppe um Hanna Vauhkonen, die 13 Magen- und 23 CRCs untersucht hat, konnte bei 20,8% der Proben männlicher Individuen beim Geschlechtmarker Amelogenin einen X,X-Genotyp finden (Vauhkonen et al. 2004). Auch Parson et al. haben bei der STR-Analyse von vier Leukämie-Zelllinien festgestellt, dass bei zwei der vier

Tumorzelllinien das Y-Chromosom verloren ging. Scheinbar wenig überrascht schreiben sie dazu knapp, dass dies bei Gewebekultur-Zelllinien häufig vorkommt. Bei ihnen ist weniger die Rede von Deletionen am Y-Chromosom, die Autoren erklären das Phänomen vielmehr – zumindest was die meisten Fälle von Veränderungen beim AMEL-Genotyp angeht – mit Aneuploidie (Parson et al. 2005).

### 4.6 Kritik Teil 1, oder wie es zu den zahlreichen Punktallegen kam

Bereits im Kapitel „Material und Methoden“ wurde beschrieben, dass ich dem Programm GeneMapper® vorgegeben habe, wie im Bereich der einzelnen DNA-Marker Allele benannt werden sollten. Es wurde auch eine bestimmte Internetseite, nämlich die STR „Standard Reference Database“ des NIST (Ruitberg et al. 2001) als Quelle dieser Informationen angegeben. Die Liste mit den Allelbezeichnungen für die Marker des Promega 1.1 Kits, an dem ich mich orientiert habe, wurde für vWA z.B. zuletzt in 2010 aktualisiert, für TH01 und TPOX in 2007, für CSF1PO Ende 2013. Die Listen zu allen in dieser Arbeit HEX gelabelten Markern wurden zuletzt in 2007 aktualisiert. Die Allelbezeichnungen wurden im Frühjahr 2013 in den GeneMapper® eingegeben, es wäre also gut möglich, dass sich bei der Aktualisierung der CSF1PO-Liste in der Zwischenzeit wichtige Änderungen die Allele betreffend hätten ergeben können. In einem Abgleich meiner Version der CSF1PO-Liste mit der geänderten Version fanden sich keine Änderungen bei den wichtigen Allelen. Die Allele der einzelnen Marker sind entscheidende Eckpfeiler, die dazu beitragen sollen, dass DNA-Profile weltweit vergleichbar sind und einheitlich aussehen. Es wäre für die alltägliche Arbeit sehr umständlich, wenn sich diese Eckpfeiler ständig ändern würden.

Wo sich eher Änderungen ergeben (Butler 1997), und das war bei CSF1PO der Fall, ist im Bereich der Punktallegen, die auf den besagten Listen „variant alleles“ genannt werden. Im Kapitel „Material und Methoden“ wurde bereits erklärt, was Punktallegen sind, und dass 9.3 beim Marker TH01 ein bekanntes Beispiel für ein Punktallegen ist. Tatsächlich hatte bei einem anderen Marker, nämlich CSF1PO das Punktallegen 9.1 Anfang 2013 eine Länge von 302 bp, Ende 2013 schließlich 304 bp. Man muss dazu aber sagen, dass es sich bei den ursprünglich 302 bp wahrscheinlich um einen Tippfehler in der Liste gehandelt hat, da die Basenpaare in den Listen normalerweise der Größe nach geordnet aufgeführt werden. In der Listen-Version vom Frühjahr 2013 waren 302 bp bereits dem Punktallegen 8.3 zugeordnet. Es folgte Allel 9 mit 303 bp, dann 9.1. Und hier hätte man jetzt > 303 bp erwartet, es stand aber wieder 302 bp dort. Bei

der Eingabe in den GeneMapper® kam es daher zu einem sog. „bin overlap“, weshalb das Allel 9.1 nicht vergeben werden konnte.

Ferner wurde im Kapitel „Material und Methoden“ erwähnt, was in den im Ergebnisteil aufgeführten Tabellen deutlich sichtbar ist: Die Ergebnisse der STR-basierten Genotypisierung der HRO-Tumormodelle enthalten zahlreiche Punktallele, auffällig viele Punktallele. Das liegt daran, dass ich diese Punktallele - die auf den Referenzlisten des amerikanischen NIST aufgeführt sind - mit eingegeben habe. Ich wusste zu diesem Zeitpunkt um die Existenz dieser Punktallele, und darum, wie sich ihre Schreibweise erklärt. Sie standen auf den besagten Listen gemeinsam mit den Konsensusallelen, mir ist zu keinem Zeitpunkt der Gedanke gekommen, dass es eventuell nicht üblich sein könnte, diese Punktallele – bis auf einige sehr wenige Ausnahmen- wie Konsensusallele einzeln einzupflegen. Auf Seite 69 des Buchs „Forensic DNA Typing“ von John Butler findet sich eine Zusammenstellung aller Allele der 13 CODIS Kern-STR-Loci. Man sieht dort zwar insgesamt selten Punktallele, aber man sieht sie, wenn auch zugegebenermaßen vor allem bei zwei Markern, mit denen hier nicht gearbeitet wurde (D18S51 und D21S11). Ich hatte diese Zusammenstellung gesehen, als ich mit dem GeneMapper® arbeitete, stutzig gemacht hat sie mich nicht. Im Gegenteil. Das Arbeiten mit den Kommazahlen - in den Excel-Tabellen habe ich die Punktallele als solche geschrieben- war zwar umständlich, ich war aber in dem Glauben, dafür genaue Ergebnisse zu erhalten, zumal ja zwischen jedem Allel vier Basenpaare liegen und es mir aufgrund der Punktallele möglich schien, dazwischen liegende Basenpaar-Längen “noch treffender“ zu benennen. Erst beim Abgleich der Daten mit den Ergebnissen eines Labors in Turin und der DSMZ wurde mir der Fehler bewusst. In Tabelle 25 (Anhang) finden sich die Allel-Bezeichnungen für jeden STR-Locus, so wie sie von der DSMZ verwendet werden. Hier sind auch Punktallele aufgeführt, sie stehen kursiv gedruckt meist hinter den Konsensusallelen. Die Punktallele wurden mit Ausnahme von 9.3 wie es üblich ist immer nach dem nächstkleineren Konsensusallel benannt, aber direkt, ohne die umständlichere Schreibweise “Konsensusallel.x“. Sie wurden praktisch behandelt, als wären sie das Konsensusallel. Dadurch erscheint der Genotyp weniger konfus, da er weniger ungerade Zahlen enthält.

Der Abgleich mit Extern wurde größtenteils nach Abschluss des praktischen Teils im Labor gemacht. Auf die Tatsache, dass ich diesen Datenabgleich schon viel eher hätte machen sollen, werde ich im Kapitel „Kritik Teil 2“ eingehen.



### 4.7 Abgleich mit externen Daten

#### 4.7.1 Abgleich mit STR-Profilen der DSMZ

Eine Anmerkung vorweg: In diesem Unterkapitel kommt es in den späteren Abschnitten zu Überlegungen, die in den Bereich Fehleranalyse gehen. Aus organisatorischen Gründen werden diese Aspekte aber bewusst hier abgehandelt.

Um eine externe Kontrolle zu haben, wurden vier Tumorzelllinien-Proben an die DSMZ geschickt, und zwar HROC18, HROC24, HROC32 und HROC40. Das von dort erhaltene STR-Profil ist für HROC18 in der ersten Zeile von Tabelle A (Siehe Anhang) dargestellt, darunter findet sich in Zeile zwei das im MOI-Labor erstellte STR-Profil. Man sieht, dass im externen HROC18-Profil keine Punktallele vorkommen. Auf das Thema Punktallele wurde bereits ausführlich im vorherigen Kapitel eingegangen, man kommt aber nicht umhin, auch an dieser Stelle auf die Punktallele zu sprechen zu kommen, ziehen sie sich doch wie ein roter Faden durch die Ergebnisse. In einem Text mag ein roter Faden von Vorteil sein, da er Orientierung gibt. Hier sorgen die Punktallele aber dafür, dass man sich so manchen Genotyp mit der Original-STR-Referenzliste an der Hand genauer anschauen muss, wenn man ihn mit extern bestimmten Genotypen vergleichen möchte. Und Übereinstimmungen sind manchmal aufgrund der Punktallele nicht offensichtlich.

Das Punktallel 7.1 bei TH01 hat in meinen Daten z.B. eine Länge von 187,73 bp, gerundet 188bp - dieser Wert steht bei TH01 für 7.1 in der NIST-Referenzliste- und unterscheidet sich vom Konsensus-Allel 7 (187bp) in lediglich einem bp. Aus meiner Sicht ist es so, dass der GeneMapper® dieses Allel mit 7 bezeichnet hätte, wenn das Punktallel gar nicht erst in das System eingepflegt worden wäre, sprich wenn das Programm im MOI-Labor gar keine Punktallele kennen würde. Und natürlich auch, wenn die Punktallele so eingepflegt worden wären, dass das jeweilige PCR-Produkt nach dem nächstkleineren Konsensusallel benannt worden wäre. Demzufolge entspricht Allel 7.1 in meinen Daten dem "externen Allel 7". Ähnlich verhält es sich bei dem Punktallel 10.1 im STR-System D5S818, das extern Allel 10 genannt würde. Wenn man es so betrachtet, dann stimmen bei HROC18 die Genotypen des MOI-Labors und der DSMZ im STR-System TH01 überein. Beim Marker TPOX liegt nun ein Fall vor, wie er eben erwähnt wurde. Hier liegt auch eine Übereinstimmung vor, die allerdings nicht offensichtlich ist.

Das Punkttallel 7.3 im STR-System TPOX hat 231bp. Das nächstkleinere Konsensus-Allel heißt bekanntlich Allel 7 (228bp), das nächstgrößere Konsensus-Allel 8 hat 232bp. Mein Ergebnis beträgt 230,56bp, was ich auf 231bp aufgerundet habe. 231bp liegt, wenn man sich die Allelbezeichnungen als kleine Flaggen auf einem Zahlenstrahl aus Basenpaaren vorstellt, eindeutig näher an der kleinen Flagge, auf der Allel 8 steht. Hier liegt schon ein Ergebnis in Basenpaaren vor, das zu den Ergebnissen aus Braunschweig passt. Das Kind hat hier aber, um es einmal sehr umgangssprachlich zu formulieren, der Punkttallele wegen einen anderen Namen, und es liegt eine Übereinstimmung vor, die erst auf den zweiten Blick ersichtlich ist.

Eine vom Zahlenwert her vollständige Übereinstimmung der Genotypen findet sich in den STR-Systemen vWA, CSF1PO und D7S820, sowie beim Geschlechtsmarker AMEL. Zählt man die Genotypen von TH01 und TPOX als Match, dann stimmt das Ergebnis für HROC18 im Vergleich mit dem der DSMZ bei sechs von insgesamt neun DNA-Markern überein. Was kann man nun aber zu den weiteren STR-Systemen sagen? D5S818 und D16S539 betreffend ist es so, dass sich “meine Allele“ um jeweils ein Allel von den Allelen, die die DSMZ gefunden hat, unterscheiden. Beim Marker D13S317 liegt sogar ein Unterschied von 3x 4bp vor: Es liegen drei Allele zwischen meinem Ergebnis und dem Ergebnis der DSMZ. Und wir werden gleich sehen, dass dieser Unterschied systematisch ist, bei allen vier Proben, die in Braunschweig analysiert wurden.

Eine weitere Probe, die auch extern analysiert wurde, ist die Tumorzelllinie HROC32 (Tabelle B, Anhang). Die gesamten Ergebnisse zum Probenblock HROC32 zeigt Tabelle 23 im Anhang dieser Arbeit. Eine vollständige Übereinstimmung der beiden STR-Profile findet sich im STR-System vWA, CSF1PO, dem Geschlechtsmarker AMEL, D5S818 (das war bei HROC18 noch anders) und D7S820. Bei TH01 und TPOX gibt es wieder eine leichte Abweichung, durch die Verwendung von Punkttallelen bedingt. Beide STR-Profile stimmen im Bereich der Marker TH01 und TPOX weitestgehend überein. Bei D16S539 liegt wie bei HROC18 jeweils ein Allel zwischen meinem Ergebnis und der externen Kontrolle. Und schließlich liegen auch bei HROC32 im STR-System D13S317 wieder drei Allele zwischen meinem Ergebnis und dem Ergebnis der DSMZ.

Beim Blick auf Tabelle C (Siehe Anhang) zum Probenblock HROC24 zeigt sich dem Betrachter im Vergleich zu den beiden vorherigen Tabellen ein deutlich unruhigeres Bild. Das liegt auch daran, dass die Tumorzelllinie HROC24 mehr heterozygote Genotypen aufweist als HROC18 oder HROC32. Auf der Suche nach Genotypen, die vollkommen übereinstimmen, stößt man

neben dem Geschlechtsmarker Amelogenin lediglich auf D7S820. Bei TH01 und TPOX geht es wieder um das Thema Punktaltele, weitestgehend stimmen die Genotypen aber auch hier überein. Im Bereich D16S539 findet sich wie schon in Tabelle A und B ein Unterschied von einem Allel, bei D13S317 von drei Allelen. Neu im Vergleich zu Tabelle A und B ist der Unterschied von einem Allel bei CSF1PO, und bei vWA und D5S818 liegt bei jeweils einem der beiden Allele des jeweiligen Locus auch ein Unterschied von einem Allel vor.

Bevor aber die bisher beschriebenen Unterschiede und Gemeinsamkeiten bewertet werden, soll mit Tabelle D (Anhang) noch kurz eine letzte Tabelle zum Thema Abgleich der MOI-Daten mit STR-Profilen der DSMZ gezeigt werden. Hier geht es um die Tumorzelllinie HROC40. Bei vWA, TH01, CSF1PO und AMEL stimmen die Ergebnisse vollkommen überein. Beim Marker TPOX findet man wieder weitestgehend eine Übereinstimmung. Im STR-System D5S818, D7S820 und D16S539 liegt jeweils ein Allel zwischen meinem Ergebnis und dem der DSMZ. Bei D13S317 beträgt der Unterschied wie bei allen anderen in Braunschweig analysierten Proben drei Allele.

Lässt sich in komprimierter Form etwas zu den Tabellen A-D sagen? Und vor allem: Sind meine Ergebnisse falsch? Ich sehe den Abgleich meiner Ergebnisse mit den Braunschweiger Ergebnissen so, als hätte ich meine Ergebnisse mit Ergebnissen einer STR-Datenbank abgeglichen. Dazu schreibt Amanda Capes-Davis: „Beim Durchsuchen einer Online-Datenbank mit STR-Profilen von Zelllinien sollte der Nutzer nach sehr ähnlichen Treffern (close matches) suchen, und nicht nur identische Profile/Treffer; die meisten Studien würden darin zustimmen, dass eine 80%ige Ähnlichkeit eine geeignete Schwelle dafür ist, von einem Treffer beim Vergleichen von Zelllinien-Profilen zu sprechen“ (Capes-Davis et al. 2010).

Nun erneut zu HROC18. Korrigiert man sowohl die Punktaltele, als auch die systematischen Unterschiede heraus, so stimmen 16 von insgesamt 18 Allelen überein, also ca. 89%. Bei HROC32 kommt man nach derselben Korrektur ebenfalls auf eine 89%ige Übereinstimmung, während sich für HROC24 eine 78%ige Übereinstimmung ergibt (12 von 18 Allelen). Bei HROC40 stimmen dann 15 von 18 Allelen überein, also 83%.

Wenn man die Marker in den Fokus nimmt, stellt sich die Lage wie folgt dar: Erfreulicherweise gibt es bei allen vier Proben keine Abweichungen, was den Genotyp beim Geschlechtsmarker Amelogenin angeht. Korrigiert man die Punktaltele heraus, so stimmen auch bei TPOX die Genotypen bei allen Proben überein.

Bei den Markern vWA, TH01, CSF1PO und D7S820 stimmen die Genotypen jeweils bei drei von vier Proben überein, wenn man denn die Punktallele herauskorrigiert.

In den STR-Systemen D13S317 und D16S539 findet sich keine Übereinstimmung. D5S818 zeigt ein gemischtes Bild (Übereinstimmung bei einer Probe, jeweils ein Allel Unterschied bei zwei Proben, bei einer Probe nur an einem der beiden Allele ein Unterschied von einem Allel).

Zu den Ursachen der Verschiebung bei den Allelen lässt sich Folgendes sagen: Vergleicht man die Primer-Sequenzen, die von der DSMZ verwendet wurden (Siehe Abb. 6 im Anhang), so finden sich bei D13S317 und vWA jeweils Unterschiede bei den Forward-Primern. Diese Unterschiede sind sowohl in Abb. 6 als auch in der Tabelle mit den Primer-Sequenzen im Kapitel „Material und Methoden“ farbig markiert. Die Primer-Sequenzen der STRBase weisen jeweils am 5'-Ende der beiden Forward-Primer drei zusätzliche Nukleotide auf.

Ebenfalls im Anhang findet sich Tabelle 25, in der die Anzahl der Allele sowie die Allel-Größe für jeden Locus, so wie sie an der DSMZ verwendet werden, dargestellt ist. Wenn man die dortigen Allel-Größen mit den Allel-Größen vergleicht (Amelogenin sei einmal ausgenommen), die für diese Arbeit unverändert der STRBase des NIST entnommen wurden, so finden sich bei der Allel-Größe Abweichungen bei sechs der acht STR-Marker. Die Allel-Größen, die für diese Arbeit verwendet wurden, verhalten sich – im Verhältnis zu den DSMZ-Allel-Größen- wie folgt:

D5S818	DSMZ-Allel-Größe + <b>1bp</b>
D13S317	DSMZ-Allel-Größe - <b>7bp</b>
D7S820	DSMZ-Allel-Größe - <b>1bp</b>
D16S539	DSMZ-Allel-Größe - <b>2bp</b>
VWA	DSMZ-Allel-Größe + <b>5bp</b>
TH01	DSMZ-Allel-Größe + <b>2bp</b>

Bei TPOX und CSF1PO stimmen die Allel-Größen überein.

Man sieht in der Tabelle, dass sich die größte Abweichung der Allel-Größen bei D13S317 zeigt, welcher einer der Marker ist, bei denen sich keine Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und den DSMZ-Genotypen findet.

An dieser Stelle zwei Überlegungen, die mit der Fluoreszenz-Markierung zu tun haben. Erstens: Anders als in der STRBase wurden hier alle Primer mit Ausnahme von Amelogenin am Forward-Primer gelabelt. In den Vorgaben auf der NIST-Seite wird mit Ausnahme von D7S820 und CSF1PO der Reverse-Primer markiert. Ich konnte diesbezüglich in Erfahrung bringen, dass es eher unwahrscheinlich ist, dass die Lage der Fluoreszenz-Markierung in der Kapillarelektrophorese ein unterschiedliches Laufverhalten verursacht. Dieser Aspekt ist auf Ursachensuche also vernachlässigbar. Zweitens: Die FAM-gelabelten Marker scheinen unproblematischer zu sein, hier gibt es insgesamt mehr Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und den STR-Profilen der DSMZ. War die HEX-Markierung keine gute Wahl? Ich konnte diesbezüglich herausfinden, dass dem nicht so sein dürfte, da die HEX-Markierung kompatibel mit der genutzten Kapillarelektrophorese ist und Probleme, wenn es sie denn diesbezüglich gäbe, eher nicht Differenzen bei der Fragmentlänge zur Folge hätten. Auch dieser Punkt spielt scheinbar keine Rolle. Ferner können sich bedingt durch die Kapillarelektrophorese mit ihrer Kalibrierung Unterschiede um ein Basenpaar ergeben (Mansfield et al. 1996).

Fest steht, dass Unterschiede bei den Primer-Sequenzen eine Ursache für die Allel-Verschiebungen darstellen. Fest steht auch, dass Allele anders organisiert wurden, sprich Allele anderen bp-Größen zugeordnet wurden, was auch zu Allel-Verschiebungen führt. Die Quelle der Allelbezeichnungen bei der DSMZ ist übrigens auch die STRBase des NIST (<http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/>). Der Unterschied müsste dann an dem jeweiligen Stand liegen. In 2013 fanden sich dort jedenfalls unter dem Link „Multiplex STR-kits“ bis auf minimalste Unterschiede die Angaben wie in 2016. Eventuell waren die dortigen Angaben vor mehr als 10 Jahren andere.

Die DSMZ hat ferner bei dem einen oder anderen Marker einige weitere Allele verwendet, ein Beispiel ist vWA. Die Bandengröße von 120-170bp lag zu Beginn meiner Arbeit bereits vor, sind doch die Bandengrößen für alle FAM-gelabelten Marker initial durch Dr. Christina Mullins (MOI-Labor) bestimmt worden (Siehe „Material und Methoden“). Darauf aufbauend verwendete ich nur Allelbezeichnungen, die sich in diesem Bereich bewegen. Ein Allel 22 (171bp) und Allel 23 (laut NIST ein Punktallel) findet sich daher bei den in dieser Arbeit verwendeten Allelbezeichnungen nicht. Die Bandengrößen der HEX-gelabelten Marker wurden von mir bestimmt. Hier wäre es, wenn alle in der STRBase des NIST aufgeführten

Allele verwendet worden wären, bei den größeren Allelen zum Überlappen mit den kleineren Allelen des nächsten Markers gekommen.

### 4.7.2 Abgleich mit STR-Profilen aus Turin

Für 19 HROC-Proben wurde auch in einem Turiner Labor eine Genotypisierung vorgenommen. Die Turiner Wissenschaftler haben mit einem Kit gearbeitet. Beim Abgleich der STR-Profile - mir liegen lediglich die Allele vor, nicht die Allel-Größen - zeigt sich ein systematischer Unterschied, was die STR-Systeme D13S317 und D16S539 angeht. Bei D13S317 sieht die Abweichung wie folgt aus: Turiner-Allelbezeichnung +3 Allele. Kommt man in Turin beispielsweise auf Allel 12, so findet sich in den MOI-STR-Profilen an der Stelle Allel 15. Bei D16S539 weichen die Allel-Bezeichnungen um ein Allel ab. Ergibt sich in Turin beispielsweise Allel 12, so zeigt sich bei mir an der Stelle Allel 11. Bei D5S818 stören erneut die Punktallele bei den von mir erstellten STR-Profilen. Abgesehen davon findet sich aber auch hier ein systematischer Unterschied von einem Allel beim ersten Allel dieses Locus, sprich die Allelbezeichnung in Turin ist immer um ein Allel höher. Beim zweiten Allel dieses Locus ist der Unterschied geringer, aber auch systematisch.

Bei den Markern TH01 und TPOX ergeben sich Unterschiede dadurch bedingt, dass in Turin bis auf das "typische" Punktallel 9.3 bei TH01 und eine einmalig vorkommende Ausnahme bei D7S820 nicht mit Punktallelen gearbeitet wurde. Die Verschiebung von plus 1bp bei TH01 und minus 1bp bei TPOX kann mit der verwendeten Kapillarelektrophorese und der entsprechenden Kalibrierung erklärt werden.

Abgesehen von einigen seltenen Ausreißern stimmen die STR-Profile bei vWA, CSF1PO, D7S820 und beim Geschlechtsmarker AMEL überein.

Die beobachteten Allelverschiebungen könnten auch hier auf unterschiedliche Primer-Sequenzen zurückzuführen sein.

### **Ausblick**

Zur Klärung der Frage, ob es sich bei den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Allelen um die tatsächlichen Allele handelt, wird die AG MOI demnächst einige Proben (alle verwendeten Marker) beispielhaft sequenzieren.

### 4.8 Kritik Teil 2: Fehleranalyse

#### **Fehler beim Pipettieren**

Beim genauen Blick auf HROC224 (Tabelle 24, Anhang) fällt auf, dass das PDX-STR-Profil im Bereich der HEX-markierten Marker von dem der übrigen HROC224-Proben abweicht, und zwar in einem Maß, das stutzig macht. Auf der Suche nach einem zu Letzteren passenden STR-Profil fand sich das Elektropherogramm mit der Nummer E06 und dem Titel HROC46 T0 M1 (Siehe ebenfalls Tabelle 23, Anhang). Die dazu passende Probe wurde beim Pipettieren in das Well neben dem HROC224 PDX-Material gegeben, dessen Elektropherogramm die Nummer D06 trägt. Da die Elektropherogramme im Bereich der FAM-markierten Marker keine Auffälligkeiten zeigen, wurden beide Proben im Labor nicht falsch etikettiert, sondern höchst wahrscheinlich beim Pipettieren vertauscht.

Abgesehen davon stimmt ein mit HROG36 betiteltes STR-Profil nicht mit dem Profil der HROG36 B-Zellen überein, wohl aber mit dem Profil von BcHROG33 P7. Es muss sich also um HROG33 handeln. Wie es zu dieser Vertauschung kam ist rückblickend nicht genau nachvollziehbar, ein Fehler wie ev. eine falsche Probenbeschriftung beim Pipettieren ist aber sehr wahrscheinlich. Eine Möglichkeit, um sicher auszuschließen, dass es nicht zu einer Vertauschung seitens des Labors gekommen ist, wäre eine Reanalyse von HROG36 um zu prüfen, ob sich dann ein zu den HROG36 B-Zellen passendes Profil ergibt.

#### **Fehler beim Geschlechtsmarker Amelogenin**

Bei HROC129 und HROC174 zeigt sich eine Änderung des AMEL-Genotyps, und zwar beim PDX-Material. Während N und T jeweils einen X,X-Genotyp aufweisen, was dem tatsächlichen Patientengeschlecht in der Norddeutschen Tumorbank entspricht, findet sich beim PDX ein X,Y-Genotyp. Eventuell denkbar wäre, dass es sich um eine Kontamination mit DNA eines männlichen Individuums handelt. Dieser Gedanke ist aber unwahrscheinlich.

Wahrscheinlicher ist, dass ein Fehler beim Pipettieren der PCR mit den HEX-gelabelten Markern und Amelogenin unterlaufen ist. Beim Blick auf die STR-Profile der HEX-gelabelten Marker finden sich Abweichungen, die aber anders als im oben genannten Fall nicht so auffällig sind, dass dem Betrachter sofort eine mögliche Probenvertauschung in den Sinn kommen würde. Die PCR, um die es geht, trägt die Nummer acht. Unter den weiteren nach dieser PCR erstellten Elektropherogrammen findet sich keines, das besser zu dem STR-Profil von N oder T bei HROC129 und HROC174 passen würde. Sicherheitshalber sollte auch über ein Reanalyse dieser beiden Proben mit den HEX gelabelten Markern und Amelogenin nachgedacht werden. Die beiden Proben wurden bei der LOH- und MSI-Auszählung nicht berücksichtigt.

#### **Kontamination bei den BcHROGs**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden acht BcHROG-Proben untersucht. In allen Elektropherogrammen zeigen sich bei TPOX zusätzlich zu den Hauptallelen zwei kleinere Peaks von ca. 222,1 und 224,7 bp Größe. Bei den jeweiligen HROG-Proben, soweit es diese gibt, finden sich diese Peaks nicht. Nun ist TPOX ein Locus, für den nicht wenige Fälle von drei Allelen bekannt sind ([http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/tri\\_tab.htm](http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/tri_tab.htm)). Aber es handelt sich bei den BcHROG-Proben nicht um drei, sondern um vier Allele, deren Bild an eine gemischte Probe erinnert, wie sie häufiger in der Forensik zu finden ist, wenn DNA von zwei Individuen gemischt vorliegt. Allerdings wären dann vier Allele in mehreren Markern zu erwarten (Clayton et al. 2004). Und selbst wenn es sich um neue zusätzliche Allele im Rahmen von MSI handeln würde, so wäre dies bei den HROGs zu erwarten, nicht bei den B-Zellen. Dass es sich in diesem Fall um eine Kontamination handeln muss wird deutlich, wenn man sich die STR-Profile von vier TiBcHROC173 anschaut, die gemeinsam mit den BcHROGs pipettiert wurden. Und tatsächlich finden sich auch hier die beiden besagten Extra-Allele. Nur dass es bei HROC173 auch ein STR-Profil des Normalgewebes gibt, in dem die zusätzlichen Allele bei TPOX nicht zu sehen sind.

#### **Technisch bedingte Artefakte**

In den Elektropherogrammen der HEX-gelabelten Marker fallen immer wieder kleine Off-Ladder Peaks auf, die an der Basis sehr schmal sind, und eher einem senkrechten Strich ähneln als einem üblichen Peak. Dazu passt, dass technische Artefakte meist schmal sind (Clayton et al. 2004). Wiederholt man die PCR, so können diese Artefakte verschwinden. Ein gutes



Beispiel zeigt sich bei HROC199 (D7S820). Die Probe wurde erneut analysiert. In dem neuen Elektropherogramm ist das Artefakt nicht mehr zu sehen (Siehe Anhang, Abb. 7).

### **Off-Ladder Allele**

In der ursprünglichen Fassung von Tabelle 15 kam bei den Ergebnissen zu HROC24 im STR-System D7S820 bis auf eine Ausnahme in allen Proben das Off-Ladder-Allel D7S820<6 (201bp) vor, auch beim Normalgewebe. Da in der Literatur Fälle von Allelen beschrieben sind, die sich im Bereich oberhalb oder unterhalb der Allel-Leiter befinden (Butler 2001), und da drei Allele an einem Locus auch möglich sind (Siehe weiter oben in der Diskussion), wäre auch das D7S820<6 Allel nicht weiter aufgefallen, wenn sich die Fälle nicht gehäuft hätten (Siehe Abb. 8 im Anhang). Auch fand sich ein zweites D7S820<6 Allel, mit 205bp. Beim Abgleich des STR-Profiles mit den Ergebnissen aus Turin fiel auf, dass Locus D13S317 nicht homozygot, sondern heterozygot ist. Auch weist D7S820 bei HROC24 nicht drei Allele auf. Es musste also ein Fehler bei der Zuordnung der Allele zu den beiden Markern unterlaufen sein. Letztendlich kam es tatsächlich zu einer systematischen Fehlzuordnung, da ich eingangs die Allele für D13S317 nur bis einschließlich Allel 15 vorgenommen hatte (197bp). Das ist das letzte Konsensusallel des Markers, dessen Produktgrößen sich zwischen 153bp und 200bp erstrecken sollten. Produktgrößen zwischen 201 und 252bp würden in den Bereich des Markers D7S820 fallen. Nun liegt das erste Konsensusallel von D7S820 bei 215bp und heißt Allel 6, mit weniger Basenpaaren finden sich lediglich zwei Punkttallele, es gibt also einen größeren Allel-freien Bereich hin zur unteren Markergrenze. Und das letzte Konsensusallel 15 bei D13S317 liegt unmittelbar an der oberen Grenze dieses Markers. Ergeben sich hier im Rahmen von MSI Allel-Verschiebungen, so gehen diese nicht selten in den Bereich > 200bp. Außerdem gibt es bei D13S317 ja auch noch die beiden Punkttallele, die ich nicht eingepflegt hatte, da der GeneMapper® sonst einen "bin overlap" angezeigt hätte: Punkttallel 16 (201bp) und 17 (205bp). Nun ist D13S317 der Marker, bei dem sich beim Vergleich mit Extern Abweichungen bei der Primersequenz zeigten. Ein Punkttallel 16 bei den Ergebnissen dieser Arbeit ist extern das Konsensusallel 13 und kommt daher auch nicht selten vor. Es wurde letztendlich manuell eine Korrektur der Allelzuordnung vorgenommen. Diese Korrektur wurde auch beim Auszählen zusätzlicher Allele und LOH-Ereignisse bedacht.

Ein anderer Fall ist ein Allel, das mit ca. 172,5 bp zwischen den Markergrenzen von vWA und TH01 liegt (Siehe Abb. 9, Anhang). Die Allel-Bezeichnungen wurden nach den mir eingangs bereits vorliegenden Bandengrößen für die FAM-gelabelten Marker eingegeben, d.h. vWA

120-170bp, TH01 180-220 bp. Ich pflegte folglich Allel 22 bei vWA nicht ein, da es mit 171bp außerhalb dieses Bereichs lag. Bei TH01 pflegte ich die Allele 3-5 nicht ein (171-179bp, und somit  $< 180$ bp). Nun liegt die Vermutung nahe, dass auch hier eine systematische Fehlzuordnung der Allele vorliegen könnte. Dagegen spricht aber, dass beide angrenzenden Loci oft bereits heterozygot sind. Der Peak zwischen den beiden Markern ist weniger häufig als der oben beschriebene Fall des vermeintlichen Allels D7S820 $<6$ . Er kommt ohne erkennbare Systematik bei so mancher Tumor- oder Xenoprobe vor, aber auch sehr oft bei Normalgewebe. Einer der beiden angrenzenden Loci würde dann beim Normalgewebe drei Allele aufweisen. Dass drei Allele bei Normalgewebe andernorts gefunden und beschrieben wurden, wurde bereits weiter oben in der Diskussion geschildert.

Crouse et al. haben aus 10.000 DNA-Proben unterschiedlicher Individuen, die mit STR-Markern untersucht wurden, 42 Proben zur weiteren Analyse herangezogen (Crouse et al. 1999). In sieben Proben fanden sich Allele zwischen den Markergrenzen, wobei TH01 mit vier Fällen die meisten Off-Ladder Fälle dieser Art zeigte (Allel TH01 $<5$ , 162.8bp). Es ist in dem Paper leider nicht ersichtlich, wie der Genotyp in allen sieben Fällen lautet, für einen TPOX-Fall wird letztendlich aber 11,  $>13$  angegeben, wonach sich dieser TPOX-Locus ohne das Off-Ladder Allel homozygot darstellte. Zunächst: Zur Überprüfung, ob es sich bei dem Allel tatsächlich um ein Punktalles außerhalb der Markergrenzen handelte, wurden die besagten Proben durch Crouse und Kollegen mit mehreren unterschiedlichen Detektionsmethoden untersucht und die Ergebnisse auf Konkordanz geprüft. Eine Vorgehensweise, die laut der Autoren sehr kostspielig ist und die Möglichkeiten kleiner Labore überschreitet.

Dann: Punktalles sind grundsätzlich selten. Hinzu kommt, was weiter oben bereits beschrieben wurde: Die an das Off-Ladder Allel angrenzenden Loci sind in den Ergebnissen dieser Arbeit oft bereits heterozygot. Wäre das besagte Allel relevant, dann würde sich so ein Tri-Allelic Pattern ergeben. Dadurch bedingt würden hier allein beim Normalgewebe mehr als 20 Fälle von drei Peaks an einem Locus entstehen, was bei weitem keine Seltenheit ist, und daher unrealistisch. Es muss sich bei dem Peak folglich um eine Kontamination oder ein Artefakt handeln, weshalb er auch bei der Auszählung neuer Allele oder LOH nicht bedacht wurde. Zeigen lässt sich dies bei HROC87N, einer Probe, in der dieser Peak vorkommt. Die B-Zellen hingegen zeigen diesen Peak nicht. TH01 ist bei HROC87N homozygot, man könnte argumentieren, dass der Peak zu TH01 gehört. Eine HROC87 Zelllinien-Probe wurde allerdings auch in Turin untersucht, wo man für TH01 einzig das Allel 8 und somit einen homozygoten Locus fand. In allen HROC87-Proben ist dieser Locus homozygot.

Eine andere Probe, PDX HROC70, wurde zweimal analysiert (Abb.9, Anhang). Im Ergebnis der ersten PCR ist kein Off-Ladder Allel zu sehen. Ein späteres Elektropherogramm zeigt einen Off-Ladder Peak. Der Peak scheint in diesem Fall nicht reproduzierbar, was gegen einen tatsächlichen Peak außerhalb der Grenzen der Allel-Leiter spräche, da diese reproduzierbar wären (Butler 2001). Allerdings zeigt die Skalierung der y-Achse in diesem Fall, dass die Intensität der Peaks in dem Elektropherogramm ohne den Extra-Peak sehr gering ist, weil bei dieser Probe möglicherweise zu wenig DNA verwendet wurde. Eventuell stellt sich der Extra-Peak daher nicht dar. Nebenbei findet man in dem Elektropherogramm zu PDX HROC70 noch eine weitere Auffälligkeit, nämlich einen kleinen zusätzlichen Peak bei TPOX. Das Auftauchen dieses Peaks, der im zweiten Elektropherogramm offensichtlich nicht erscheint, dürfte sich auch mit einer ev. zu geringen DNA-Konzentration der Probe erklären. Hierzu passt das Ergebnis einer Arbeitsgruppe, die sowohl Paraffin-eingebettete, als auch frisch gefrorene DNA-Proben mit unterschiedlichen DNA-Konzentrationen untersucht hat. Die Forscher haben festgestellt, dass mit abnehmendem DNA-Gehalt einer Probe die MSI-Artefakte signifikant zunehmen. Diese MSI-Artefakte sind nicht reproduzierbar (Sieben et al. 2000).

HHC6538 T0 M1 wurde ebenfalls zweimal analysiert, hier findet sich der Extra-Peak zwischen vWA und TH01 in beiden Elektropherogrammen, ist also reproduzierbar (Abb. 10, Anhang). Welcher Natur dieser Peak auch immer sein mag, es handelt sich aus meiner Sicht nicht um ein Punktalles zwischen den Markergrenzen, sondern wahrscheinlich um eine Kontamination. Dazu würde passen, dass sich eine Kontamination mit einer exogenen DNA-Quelle, obwohl sie sich eigentlich in mehreren Loci zeigen würde, in manchen Fällen auch in Form nur eines zusätzlichen Peaks zeigen kann (Clayton et al. 2004).

Kurz vor dem Ende dieser Fehleranalyse noch ein paar Worte zu HROC107, dem Probenblock, bei dem das STR-Profil der TiBc in einem Marker vom STR-Profil des Normalgewebes abweicht. Es ist schwierig, für das zusätzliche Allel D5S818-14 eine Erklärung zu finden, müssten doch beide Profile übereinstimmen. Wenn es sich nicht um eine Kontamination handelt, dann könnte sich das neue Allel eventuell mit einer Veränderung im Rahmen der höheren Passage der TiBc erklären, zumal es sich hier um Passage 33 handelt. Um Gewissheit zu haben könnte in diesem Fall sowohl über eine Reanalyse der TiBc-Probe, als auch über die Analyse einer TiBc-Probe mit niedrigerer Passage nachgedacht werden. Glücklicherweise handelt es sich hier aber um einen Einzelfall und es ist davon auszugehen, dass das STR-Profil des Normalgewebes das Profil ist, an dem es sich beim Vergleich mit den STR-Profilen anderer Materialien dieses Probenblocks zu orientieren gilt.

### **Kritik an der Vorgehensweise**

Zu Beginn dieser Arbeit gab es einige Vorgaben. So stand bereits fest, dass wie zur Identitätsprüfung von Zelllinien international üblich STR-Marker verwendet werden sollten. Die FAM-gelabelten Marker waren wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben bereits vorhanden, da angedacht war, einzig mit diesen vier Markern und dem Geschlechtsmarker Amelogenin zu arbeiten. Ferner stand nicht nur fest, dass kein fertiges STR-Kit verwendet werden sollte, sondern auch, dass zur Erstellung der Elektropherogramme das Programm GeneMapper® genutzt werden sollte. Im Zuge einer ersten Literaturrecherche stellte ich fest, dass die Marker-Anzahl um mindestens vier Marker würde erweitert werden müssen, und dass es außerdem eines zusätzlichen Fluorophors bedurfte. So kam es zu den vier HEX-gelabelten Markern.

Rückblickend betrachtet hätte man den Etablierungsprozess anders gestalten müssen. Man hätte eher fragen müssen, ob vier Marker plus Amelogenin überhaupt ausreichen, um eine vernünftige Genotypisierung durchzuführen. Und man hätte sich theoretisch für die Verwendung eines Kits entscheiden sollen. Der Vorteil ist, dass für eine Probe nicht zwei Multiplex-PCRs gemacht werden müssen, sondern nur eine. Mehr Pipettieren bedeutet nicht nur einen größeren Zeitaufwand, sondern erhöht auch die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination. Außerdem werden in den Kits die Primersequenzen verwendet, die Standard sind. Minimale technisch bedingte Abweichungen in den Ergebnissen können vorkommen, aber größere Verschiebungen bei den Allelen mehrerer Marker sind nicht nur unschön, sie erschweren den Abgleich mit Extern. Dabei sollen STR-Profile weltweit vergleichbar sein.

Praktisch sieht es allerdings so aus, dass Kits so kostspielig sind, dass deren Verwendung leider nicht finanzierbar gewesen wäre.

Und noch ein letzter Punkt: Man hätte zunächst nur sieben bis zehn Proben analysieren sollen, um dann umgehend die Ergebnisse mit Extern abzugleichen. Und man hätte erst nach Ausräumung aller Unstimmigkeiten weiterarbeiten sollen.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine STR-basierte Genotypisierung der Rostocker Tumormodelle durchgeführt. Es wurden insgesamt 395 Proben analysiert, hauptsächlich Proben des CRC. Zu diesem Zweck wurde ein 9 Marker umfassender DNA-Fingerprint-Test im Labor der AG MOI der Universität Rostock etabliert. Das Ergebnis der Analyse ist insofern zufriedenstellend, als sich anhand der STR-Profile keine Hinweise auf stattgehabte Probenvertauschungen vonseiten des Labors fanden. Auch konnten anhand der STR-Profile nicht nur Phänomene wie der Verlust der Heterozygotizität oder das Auftauchen neuer Allele bei Tumorproben beobachtet und ausgewertet werden, es wurde auch deutlich, dass sich die jeweiligen Komponenten eines Probenblocks aufgrund dieser Phänomene unterscheiden.

Bis zum heutigen Tag bekommt das MOI-Labor von seinen Geldgebern übrigens kein zusätzliches Budget für den STR-Fingerprint. Es wäre für alle Labore wünschenswert, wenn es nicht nur bei Artikeln bliebe, in denen die Geldgeber gebeten werden, auch Kosten für den Fingerprint zu bedenken, sondern wenn diese Forderung auch Gehör finden würde. In der Wissenschaft ist es nun mal wie in anderen Bereichen auch: Qualität hat ihren Preis.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

A: Adenin

Al: Allel

AMELY: Amelogenin-Gen auf dem Y-Chromosom

Aqua dest.: destilliertes Wasser

ATCC: American Type Culture Collection

Bc: B-Zelle(n)

bp: Basenpaar(e) ; kb: kilo Basenpaare

° C: Grad Celsius

C: Cytosin

CIMP: CpG Island Methylator Phenotype

CIN: chromosomal instability

CODIS: Combined DNA Index System

CRC: colorectal carcinoma, kolorektales Karzinom

DNA: Desoxyribonukleinsäure

dNTP: Desoxynukleosidtriphosphate

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

EC: Endometrium-Karzinom

f: female, weiblich

FAM: Fluoreszenz-Markierung

FAP: Familiäre adenomatöse Polyposis

g: Gramm

G: Guanin

gDNA: genomische DNA

HEX: Fluoreszenz-Markierung

HNPCC: Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer

HROC: Hansestadt Rostock Colon-Karzinom

HROG: Hansestadt Rostock Glioblastom

LOH: Verlust der Heterozygotizität

LS: Lynch-Syndrom

m: male, männlich

Min: Minuten

Met: Metastase

MM: Master Mix

MMR: Mismatch repair

MOI: AG Molekulare Onkologie und Immuntherapie der Klinik für Allgemeinchirurgie,  
Universität Rostock

MSI: Mikrosatelliten instabil (e) (Zellen); Mikrosatelliteninstabilität

MSS: Mikrosatelliten stabil(e) Zellen

N: Normalgewebe

NCI : National Cancer Institute

NIST: National Institute of Standards and Technology

o-l : off-ladder

P: Passage

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDX: Patient-Derived Xenograft

PHR: Peak Height Ratio

PM: Primer Mix

STRs: Short Tandem Repeats

T: Thymin

T [Hauptsächlich verwendet, vor allem im Ergebnisteil]: Tumorgewebe

TAE: Tris-Acetat-EDTA

TiBc: Tumor infiltrierende B-Zellen

UV: Ultraviolett

V: Volt

μ: Mikro; μl : Mikroliter ; μM: Mikromolar

Y: Y-Chromosom

ZNS: Zentrales Nervensystem



## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleich von DNA-Typing Technologien (Butler 2001).....	4
Abbildung 2: Zitate, in denen von T24 Blasenkarzinom-Zellen als normale Endothelzellen gesprochen wurde (Masters und Mitglieder der Arbeitsgruppe ASN-0002 der ATCC SDO 2010).....	6
Abbildung 3: Prinzip der Kapillarelektrophorese (Wätzig 2014) .....	20
Abbildung 4: Lokalisation der DNA-Marker auf "ihren" Chromosomen (Butler 2001) .....	23
Abbildung 5: Eine mögliche Erklärung für drei Allele mit unterschiedlichen Peak-Höhen an einem heterozygoten Locus. Zwei Zellen vollziehen eine Teilung im Rahmen der Mitose. Bei einer der beiden Zellen kommt es zu einer Mutation (Stern). Das ursprüngliche Allel 14 verliert dabei eine Wiederholungseinheit (4bp), wodurch Allel 13 entsteht (Clayton et al. 2004). ....	62
Abbildung 6: Genomische Lokalisation und STR-Primer-Sequenzen, so wie sie an der DSMZ in Braunschweig verwendet werden. Aus: Dirks et al. 2005. Der Bereich, in dem sich in der STRBase des NIST mit Stand Frühjahr 2013 zusätzliche Nukleotide finden, rot markiert. Die jeweiligen Nukleotide sind in der Primerliste im Kapitel „Material und Methoden“ dieser Arbeit ebenfalls farbig markiert. ....	119
Abbildung 7: Zu technischen Artefakten. Die x-Achse der Elektropherogramme zeigt die Länge der PCR-Produkte in bp, die y-Achse die Peakhöhe in Fluoreszenzeinheiten. Das obere Elektropherogramm weist ein Artefakt bei D7S820 auf. HROC99Tu wurde reanalysiert. Im neuen Elektropherogramm (unten) ist der Extra-Peak nicht mehr zu sehen. ....	120
Abbildung 8: Elektropherogramm von HROC68T0M1. Der erste Peak im STR-System D7S820 zeigt das vermeintliche Allel D7S820<6. D7S820 weist in diesem Fall schon zwei Hauptallele auf, während D13S317 homozygot ist. Die roten Dreiecke stellen die Markergrenzen dar. Der Extrapeak (201bp) gehört zu D13S317 und ist das dortige Punktallel 17. ....	120
Abbildung 9: Xenotumor 70, zwei Elektropherogramme unterschiedlichen Datums. Das obere Elektropherogramm zeigt einen Peak zwischen den Markern vWA und TH01. Auf dem unteren Elektropherogramm ist dieser Extrapeak nicht zu sehen. Nebenbei sieht man am Beispiel dieser Proben, dass es manchmal von Vorteil ist, eine Probe erneut zu analysieren. Der kleine erste Peak bei TPOX ist kein neues Allel, er tritt bei der Reanalyse nicht mehr auf. ....	121

Abbildung 10: Probe HHC6538T0M1 wurde reanalysiert, in beiden Elektropherogrammen zeigt sich ein Peak im Bereich zwischen den Markergrenzen von vWA und TH01. Der Unterschied in der Peakhöhe hängt mit unterschiedlichen Einstellungen der y-Achse zusammen. .... 122

Abbildung 11: Elektropherogramme von vier STR-Loci zu HROC126. Das obere Elektropherogramm gehört zum Normalgewebe, das untere zum Tumormaterial. Die x-Achse zeigt die Länge der PCR-Produkte in bp, die y-Achse die Peakhöhe in Fluoreszenzeinheiten. Beim Marker vWA zeigt sich ein Fall von MSI. Das Ursprungsallel 18 wurde im Vergleich zum Normalgewebe kleiner, ein neuer Peak ist rechts von Allel 18 zu sehen. Beim Marker CSF1PO ist Allel 12 beim Tumormaterial deutlich kleiner als im Elektropherogramm des Normalgewebes. Hier zeigt sich ein Fall von LOH. .... 122

Abbildung 12: Elektropherogramm der HROC57 Krebszelllinie (unten). Beim Marker vWA zeigen sich unausgewogene Peak-Höhen. Zum Vergleich darüber das Elektropherogramm der FAM-gelabelten Marker für die HROC 57 B-Zellen. Hier finden sich bei vWA ausgewogene Peak-Höhen. .... 123

Abbildung 13: Untereinander dargestellt sind die Elektropherogramme von HROC43 Normalgewebe, Tumor und Tumorzelllinie (P30). Die x-Achse der Elektropherogramme zeigt die Länge der PCR-Produkte in bp, die y-Achse die Peakhöhe in Fluoreszenzeinheiten. Während CSF1PO bei N und T einen heterozygoten Genotyp aufweist, zeigt sich bei der Tumorzelllinie ein homozygoter Genotyp. Dies ist ein Beispiel für LOH. Auch liefert die Tumorzelllinie beim Marker vWA ein Beispiel für das Auftauchen neuer Allele. .... 123

Abbildung 14: LOH bei HROC-Tumorproben .....43

Abbildung 15: Verteilung der LOH-Ereignisse auf die jeweiligen Marker.....43

Abbildung 16: LOH bei HROC-Tumorzelllinien.....44

Abbildung 17: Verteilung der LOH-Ereignisse auf die jeweiligen Marker.....45

Abbildung 18: LOH bei HROC-Tumorzelllinien (im Vergleich zum Originaltumor).....45

Abbildung 19: Verteilung der LOH-Ereignisse auf die jeweiligen Marker.....46

Abbildung 20: LOH bei HROC-PDX.....47

Abbildung 21: Verteilung der LOH-Ereignisse auf die jeweiligen Marker.....47

Abbildung 22: LOH bei HROC-PDX-abgeleiteten Zelllinien.....48

Abbildung 23: Verteilung der LOH-Ereignisse auf die jeweiligen Marker.....48

Abbildung 24: Neue Allele beim HROC-Tumormaterial.....50

Abbildung 25: Zu den Phänomenen MSI und LOH bei 89 analysierten HROC-Tumorproben.....51

Abbildung 26: Neue Allele bei den HROC-Tumorzelllinien .....52

Abbildung 27: Neue Allele bei PDX im Vergleich zu Original-Tumoren.....	53
---	----

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: HROC18.....	26
Tabelle 2: HROC40.....	27
Tabelle 3: HROC43.....	28
Tabelle 4: HROC60.....	28
Tabelle 5: HROC57.....	29
Tabelle 6: HROC103.....	30
Tabelle 7: HROC80.....	31
Tabelle 8: HROC39.....	31
Tabelle 9: HROC107.....	32
Tabelle 10: HROC147.....	32
Tabelle 11: HROC173.....	33
Tabelle 12: HROC112.....	34
Tabelle 13: HROC130.....	34
Tabelle 14: HROC72.....	35
Tabelle 15: HROC24.....	36
Tabelle 16: HROC87.....	37
Tabelle 17: HROC113.....	38
Tabelle 18: HROC123.....	39
Tabelle 19: HROC131.....	39
Tabelle 20: HROC159.....	40
Tabelle 21: HROC175.....	41
Tabelle 22: HROC257.....	41

Tabelle 23: HROC32.....	115
Tabelle 24: HROC46 und HROC224.....	117
Tabelle 25: Allel-Anzahl und Allel-Größen für jeden STR-Locus, so wie sie an der DSMZ in Braunschweig verwendet werden. Die regulären Fragmente sind normal, die Punktallele kursiv (meist dahinter) geschrieben. Aus: (Dirks et al. 2005).....	118
Tabelle 26: MSI-Inzidenz bei unterschiedlichen sporadischen Tumorentitäten (Vauhkonen et al. 2004).....	118
Tabelle 27: Zu den verwendeten Markern.....	115
Tabelle A: HROC18.....	116
Tabelle B: HROC32.....	116
Tabelle C: HROC24.....	116
Tabelle D: HROC40.....	117

## 9 Literaturverzeichnis

- Aaltonen, Lauri A.; Peltomäki, Paivi; Leach, Fredrick S.; Sistonen, Pertti; Pylkkanen, Lea; Mecklin, Jukka-Pekka Järvinen, Heikki et al. (1993): Clues to the Pathogenesis of Familial Colorectal Cancer. In: *Science* 260, S. 812–816.
- Alonso, Michelle; Hamelin, Richard; Kim, Mimi; Porwancher, Kara; Sung, Tammy; Parhar, Preeti et al. (2001): Microsatellite Instability Occurs in Distinct Subtypes of Pediatric but not Adult Central Nervous System Tumors. In: *Cancer Research* 61, 2124–2128.
- Baisse, B.; Bouzourene, H.; Saraga, E. P.; Bosman, F. T.; Benhattar, J. (2001): Intratumor genetic heterogeneity in advanced human colorectal adenocarcinoma. In: *International journal of cancer* 93 (3), S. 346–352.
- Berglind, Hanna; Pawitan, Yudi; Kato, Shunsuke; Ishioka, Chikashi; Soussi, Thierry (2014): Analysis of p53 mutation status in human cancer cell lines. A paradigm for cell line cross-contamination. In: *Cancer Biology & Therapy* 7 (5), S. 699–708. DOI: 10.4161/cbt.7.5.5712.
- Blanco-Calvo, Moises; Concha, Angel; Figueroa, Angelica; Garrido, Federico; Valladares-Ayerbes, Manuel (2015): Colorectal Cancer Classification and Cell Heterogeneity: A Systems Oncology Approach. In: *International journal of molecular sciences* 16 (6), S. 13610–13632. DOI: 10.3390/ijms160613610.
- Boland, Clement Richard; Goel, Ajay (2010): Microsatellite instability in colorectal cancer. In: *Gastroenterology* 138 (6), 2073–2087.e3. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.12.064.
- Boland, Clement Richard; Thibodeau, Stephen N.; Hamilton, Stanley R.; Sidransky, David; Eshleman, James R.; Burt, Randall W. et al. (1998): A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Cancer Detection and Familial Predisposition: Development of International Criteria for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. In: *Biological Chemistry* 379 (1), S. 5248–5257. DOI: 10.1515/bchm.1998.379.1.87.
- Brentnall, Teresa A.; Chen, Ru; Lee, John G.; Kimmey, Michael B.; Bronner, Mary P.; Raggiti, Rodger C. et al. (1995): Microsatellite Instability and K-ras Mutations Associated with Pancreatic Adenocarcinoma and Pancreatitis. In: *Cancer Research* 55, S. 4264–4267.
- Brown, Terry A. (2007): *Genome und Gene. Lehrbuch der molekularen Genetik*. 3. Aufl. [der Orig.-Ausg.] = 1. Aufl. [der dt. Ausg.]. Berlin: Spektrum Akad. Verl.
- Butler, John M. (1997). Unter Mitarbeit von Reeder, Dennis J. et al. Hg. v. National Institute of Standards and Technology. Online verfügbar unter [http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/var\\_tab.htm](http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/var_tab.htm), zuletzt aktualisiert am 17.10.2016.
- Butler, John M. (2001): *Forensic DNA typing. Biology & technology behind STR markers*. San Diego: Acad. Press.
- Butler, John M. (2006): Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. In: *Journal of Forensic Sciences* 51 (2), S. 253–265. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2006.00046.x.

- Capes-Davis, Amanda; Theodosopoulos, George; Atkin, Isobel; Drexler, Hans G.; Kohara, Arihiro; MacLeod, Roderick A. F. et al. (2010): Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. In: *International journal of cancer* 127 (1), S. 1–8. DOI: 10.1002/ijc.25242.
- Cawkwell, Lynn; Bell, S. M.; Lewis, F. A.; Dixon, M. F.; Taylor, G. R.; Quirke, P. (1993): Rapid detection of allele loss in colorectal tumours using microsatellites and fluorescent DNA technology. In: *British Journal of Cancer* 67 (6), S. 1262–1267. DOI: 10.1038/bjc.1993.236.
- Chiappini, Franck; Gross-Goupil, Marine; Saffroy, Raphael; Azoulay, Daniel; Emile, Jean-Francois; Veillhan, Luc-Antoine et al. (2004): Microsatellite instability mutator phenotype in hepatocellular carcinoma in non-alcoholic and non-virally infected normal livers. In: *Carcinogenesis* 25 (4), S. 541–547. DOI: 10.1093/carcin/bgh035.
- Clayton, Tim M.; Guest, Jennifer L.; Urquhart, Andy J.; Gill, Peter D. (2004): A Genetic Basis for Anomalous Band Patterns Encountered During DNA STR Profiling. In: *J. Forensic Sci.* 49 (6), S. 1–8. DOI: 10.1520/JFS2003145.
- Crouse, Cecelia A.; Rogers, Sue; Amriott, Elizabeth; Gibson, Sandra; Masibay, Arni (1999): Analysis and Interpretation of Short Tandem Repeat Microvariants and Three-Banded Allele Patterns Using Multiple Allele Detection Systems. In: *J. Forensic Sci.* 44 (1), 14416J. DOI: 10.1520/JFS14416J.
- Crucianelli, Francesca; Tricarico, Rossella; Turchetti, Daniela; Gorelli, Greta; Gensini, Francesca; Sestini, Roberta et al. (2014): MLH1 constitutional and somatic methylation in patients with MLH1 negative tumors fulfilling the revised Bethesda criteria. In: *Epigenetics* 9 (10), S. 1431–1438. DOI: 10.4161/15592294.2014.970080.
- Dienstmann, Rodrigo; Salazar, Ramon; Tabernero, Josep (2014): The evolution of our molecular understanding of colorectal cancer: what we are doing now, what the future holds, and how tumor profiling is just the beginning. In: *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Meeting*, S. 91–99. DOI: 10.14694/EdBook\_AM.2014.34.91.
- Dietmaier, Wolfgang; Wallinger, Sabine; Bocker, Tina; Kullmann, Frank; Fishel, Richard; Rüschoff, Josef (1997): Diagnostic Microsatellite Instability: Definition and Correlation with Mismatch Repair Protein Expression. In: *Cancer Research* 57, S. 4749–4756.
- Dirks, Wilhelm G. (2010): Cell line cross-contamination initiative: an interactive reference database of STR profiles covering common cancer cell lines. In: *International journal of cancer* 126, S. 303–304.
- Dirks, Wilhelm G.; Drexler, Hans G. (2003): Authentication of Cancer Cell Lines by DNA Fingerprinting. In: Simon P. Langdon (Hg.): *Cancer Cell Culture*, Bd. 88. New Jersey: Humana Press, S. 43–56.
- Dirks, Wilhelm Gerhard; Fährnich, Silke; Estella, Isabelle Annick Janine; Drexler, Hans Günter (2005): Short Tandem Repeat DNA Typing Provides an International Reference Standard for Authentication of Human Cell Lines. In: *ALTEX\_ Alternatives to animal experimentation* 22, S. 3–9.
- Domcke, Silvia; Sinha, Rileen; Levine, Douglas A.; Sander, Chris; Schultz, Nikolaus (2013): Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. In: *Nature communications* 4, S. 1–10. DOI: 10.1038/ncomms3126.

- Ender, Volker (2015): *Praktikum Physikalische Chemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Fearon, Eric R.; Vogelstein, Bert (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. In: *Cell* 61 (5), S. 759–767. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90186-I.
- Freshney, R. Ian (2010): Database of misidentified cell lines. In: *International journal of cancer* 126 (1), S. 302. DOI: 10.1002/ijc.24998.
- Gelsomino, Fabio; Barbolini, Monica; Spallanzani, Andrea; Pugliese, Giuseppe; Cascinu, Stefano (2016): The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. In: *Cancer treatment reviews* 51, S. 19–26. DOI: 10.1016/j.ctrv.2016.10.005.
- Ghimenti, Chiara.; Tannergard, P.; Wahlberg, S.; Liu, T.; Giulianotti, P. G.; Mosca, F. et al. (1999): Microsatellite instability and mismatch repair gene inactivation in sporadic pancreatic and colon tumours. In: *British Journal of Cancer* 80 (1-2), S. 11–16. DOI: 10.1038/sj.bjc.6690314.
- Giardiello, Francis M.; Brensinger, Jill D.; Petersen, Gloria M. (2001): AGA technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing. In: *Gastroenterology* 121 (1), S. 198–213. DOI: 10.1053/gast.2001.25581.
- Gill, Peter; Sparkes, R.; Kimpton, C. (1997): Development of guidelines to designate alleles using an STR multiplex system. In: *Forensic science international* 89, S. 185–197.
- Goel, Ajay; Arnold, Christian N.; Niedzwiecki, Donna; Chang, Dong K.; Ricciardiello, Luigi; Carethers, John M. et al. (2003): Characterization of Sporadic Colon Cancer by Patterns of Genomic Instability. In: *Cancer Research* 63, S. 1608–1614.
- Goodspeed, Andrew; Heiser, Laura M.; Gray, Joe W.; Costello, James C. (2016): Tumor-Derived Cell Lines as Molecular Models of Cancer Pharmacogenomics. In: *Molecular cancer research : MCR* 14 (1), S. 3–13. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0189.
- Halford, Sarah; Sasieni, Peter; Rowan, Andrew; Wasan, Harpreet; Bodmer, Walter; Talbot, Ian et al. (2002): Low-Level Microsatellite Instability Occurs in Most Colorectal Cancers and Is a Nonrandomly Distributed Quantitative Trait. In: *Cancer Research* 62, S. 53–57.
- Han, Hye-Jung; Yanagisawa, Akio; Kato, Yo; Park, Jae-Gahb; Nakamura, Yusuke (1993): Genetic Instability in Pancreatic Cancer and Poorly Differentiated Type of Gastric Cancer. In: *Cancer Research* 53, S. 5087–5089.
- Hauge, Xueya.; Litt, M. (1993): A study of the origin of 'shadow bands' seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR. In: *Human Molecular Genetics* 2, S. 411–415.
- Heinrich, Peter C.; Müller, Matthias; Graeve, Lutz (Hg.) (2014): *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch).
- Hoang, Jean-Marc; Cottu, Paul H.; Thuille, Benedicte; Salmon, Rémi J.; Thomas, Gilles; Hamelin, Richard (1997): BAT-26, an Indicator of the Replication Error Phenotype in Colorectal Cancers and Cell Lines. In: *Cancer Research* 57, S. 300–303.
- Hoff-Olsen, Per; MELING, G. I.; OLAISEN, B. (1998): Variation in mutation rate and direction between tetranucleotide STR loci in human colorectal carcinomas. In: *Ann. Hum. Genet.* 62 (1), S. 1–7. DOI: 10.1017/S0003480098006629.



International Agency for Research on Cancer (2015): Colorectal Cancer: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Hg. v. World Health Organization. Online verfügbar unter [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx).

Kambara, Takeshi; Matsubara, Nagahide; Nakagawa, Hitoshi; Notohara, Kenji; Nagasaka, Takeshi; Yoshino, Tadashi et al. (2001): High Frequency of Low-Level Microsatellite Instability in Early Colorectal Cancer. In: *Cancer Research* 61, S. 7743–7746.

Keller, Gisela; Rotter, Michael; Vogelsang, Holger; Bischoff, Petra; Becker, Karl-Friedrich; Mueller, James et al. (1995): Microsatellite Instability in Adenocarcinomas of the Upper Gastrointestinal Tract. In: *American Journal of Pathology* 147, 593-600. DOI: 10.1163/003925995X00116.

Kim, Hoguen; Jen, Jin; Vogelstein, Bert; Hamilton, Stanley R. (1994): Clinical and Pathological Characteristics of Sporadic Colorectal Carcinomas with DNA Replication Errors in Microsatellite Sequences. In: *American Journal of Pathology* 145, S. 148–156.

Kim, Il-Jin; Kang, Hio Chung; Park, Jae-Hyun; Shin, Yong; Ku, Ja-Lok; Lim, Seok-Byung et al. (2003): Development and Applications of a Beta-Catenin Oligonucleotide Microarray: Beta-Catenin Mutations Are Dominantly Found in the Proximal Colon Cancers with Microsatellite Instability. In: *Clinical Cancer Research* 9, S. 2920–2925.

Kim, Young Beak; Lee, Sun-Young; Kim, Jeong Hwan; Sung, In-Kyung; Park, Hyung Seok; Shim, Chan Sup; Han, Hye Seung (2016): Microsatellite Instability of Gastric and Colorectal Cancers as a Predictor of Synchronous Gastric or Colorectal Neoplasms. In: *Gut and liver* 10 (2), S. 220–227. DOI: 10.5009/gnl14310.

Kline, Margaret (2009): STR Profiling Matching Criteria: How to make a useful cell line database. ASCB 49th Annual Meeting. National Institute of Standards and Technology. ASCB. San Diego CA, 06.12.2009.

Knudson, Alfred G. (1971): Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. In: *PNAS\_Proceedings of the National Academy of Sciences* 68, 820-823.

Knudson, Alfred G. (1996): Hereditary cancer: Two hits revisited. In: *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 122, S. 135–140.

Koreth, John; O'Leary, John J.; McGee, James O'D (1996): Microsatellites and PCR genomic analysis. In: *Journal of Pathology* 108 (3-4). DOI: 10.1515/semi.1996.108.3-4.307.

La Chapelle, Albert de (2003): Microsatellite Instability. In: *The New England Journal of Medicine* 349 (3), S. 209–210.

Laubert, Tilman; Freitag-Wolf, Sandra; Linnebacher, Michael; König, Alexandra; Vollmar, Brigitte; Habermann, Jens K. (2015): Stage-specific frequency and prognostic significance of aneuploidy in patients with sporadic colorectal cancer--a meta-analysis and current overview. In: *International journal of colorectal disease* 30 (8), S. 1015–1028. DOI: 10.1007/s00384-015-2259-x.

Lengauer, Christoph; Kinzler, Kenneth W.; Vogelstein, Bert (1997): Genetic instability in colorectal cancers. In: *Nature* 386, S. 623–627.

Lin, Elaine I.; Tseng, Li-Hui; Gocke, Christopher D.; Reil, Stacy; Le, Dung T.; Azad, Nilofer S.; Eshleman, James R. (2015): Mutational profiling of colorectal cancers with microsatellite instability. In: *Oncotarget* 6 (39), S. 42334–42344. DOI: 10.18632/oncotarget.5997.

- Lindforss, Ulrik; Papadogiannakis, N.; Zetterquist, H.; Lindberg, G.; Olivecrona, H. (2003): Distribution of genetic variants in preneoplastic areas of colorectal tumours. In: *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* 29 (6), S. 491–496. DOI: 10.1016/S0748-7983(03)00075-1.
- Lothe, Ragnhild A.; Peltomäki, Päivi; Meling, Gunn Iren; Aaltonen, Lauri A.; Nyström-Lahti, Minna; Pylkkänen, Lea et al. (1993): Genomic Instability in Colorectal Cancer: Relationship to Clinicopathological Variables and Family History. In: *Cancer Research* 53, S. 5849–5852.
- Lygo, Joan E.; Johnson, P. E.; Holdaway, D. J.; Woodroffe, S.; Kimpton, C. P.; Gill, P. et al. (1994): The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework. In: *Int J Leg Med* 107 (2), S. 77–89. DOI: 10.1007/BF01225493.
- Mannucci, Armando; Sullivan, Kevin M.; Ivanov, Pavel L.; Gill, Peter (1994): Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin. In: *International Journal of Legal Medicine* (106), S. 190–193.
- Mansfield, Elaine S.; Vainer, Marina; Enad, Shellee; Barker, David L.; Harris, Dennis; Rappaport, Eric; Fortina, Paolo (1996): Sensitivity, Reproducibility, and Accuracy in Short Tandem Repeat Genotyping Using Capillary Array Electrophoresis. In: *Genome research* 6, S. 893–903.
- Martinez, Ramon; Schackert, Hans-K; Plaschke, Jens; Baretton, Gustavo; Appelt, Hella; Schackert, Gabriele (2004): Molecular mechanisms associated with chromosomal and microsatellite instability in sporadic glioblastoma multiforme. In: *Oncology* 66 (5), S. 395–403. DOI: 10.1159/000079488.
- Masters, John R.; Thomson, J. A.; Daly-Burns, B.; Reid, Y. A.; Dirks, W. G.; Packer, P. et al. (2001): Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (14), S. 8012–8017. DOI: 10.1073/pnas.121616198.
- Masters, John R. W.; Mitglieder der Arbeitsgruppe ASN-0002 der ATCC SDO (2010): Cell line misidentification: the beginning of the end. In: *Nature reviews. Cancer* 10 (6), S. 441–448. DOI: 10.1038/nrc2852.
- Mitchell, R. J.; Kreskas, M.; Baxter, E.; Buffalino, L.; van Oorschot, R. A. H. (2006): An investigation of sequence deletions of amelogenin (AMELY), a Y-chromosome locus commonly used for gender determination. In: *Annals of human biology* 33 (2), S. 227–240. DOI: 10.1080/03014460600594620.
- Mouradov, Dmitri; Sloggett, Clare; Jorissen, Robert N.; Love, Christopher G.; Li, Shan; Burgess, Antony W. et al. (2014): Colorectal cancer cell lines are representative models of the main molecular subtypes of primary cancer. In: *Cancer Research* 74 (12), S. 3238–3247. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0013.
- Mülhardt, Cornel (2013): Das Werkzeug. In: Cornel Mülhardt (Hg.): *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 47–80.
- Niemeyer, Charlotte; Rössler, J. (2013): Krebserkrankungen. In: Berthold Koletzko (Hg.): *Kinder- und Jugendmedizin*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch), S. 314.

- Nims, Raymond W.; Sykes, Greg; Cottrill, Karin; Ikonomi, Pranvera; Elmore, Eugene (2010): Short tandem repeat profiling: part of an overall strategy for reducing the frequency of cell misidentification. In: *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 46 (10), S. 811–819. DOI: 10.1007/s11626-010-9352-9.
- Orlandi, Francesca; Barucca, Alessandra; Biagini, Guido; Pasqui, Gastone; Mottolèse, Marcella; Botti, Claudio et al. (2002): Molecular Stability of DNA Typing Short Tandem Repeats in the Mammary Tissue of Patients with Breast Cancer. In: *Diagnostic Molecular Pathology* 11 (1), S. 41–46. DOI: 10.1097/00019606-200203000-00008.
- Parson, Walther; Kirchbner, Romana; Muhlmann, Roswitha; Renner, Kathrin; Kofler, Anita; Schmidt, Stefan; Kofler, Reinhard (2005): Cancer cell line identification by short tandem repeat profiling: power and limitations. In: *FASEB journal* 19 (3), S. 434–436. DOI: 10.1096/fj.04-3062fje.
- Pathak, Sen; Nemeth, Margit A.; Multani, Asha S. (1998): Human tumor xenografts in nude mice are not always of human origin. In: *Cancer* 83 (9), S. 1891–1893. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0142(19981101)83:9<1891::AID-CNCR3>3.0.CO;2-U.
- Peinado, Miguel A.; Malkhosyan, Sergei; Velazquez, Antonia; Perucho, Manuel (1992): Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. In: *PNAS\_Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, S. 10065–10069.
- Peltomäki, Paivi; Lothe, Ragnhild A.; Aaltonen, Lauri A.; Pylkkänen, Lea; Nyström-Lahti, Minna; Seruca, Raquel et al. (1993): Microsatellite Instability Is Associated with Tumors That Characterize the Hereditary Non-Polyposis Colorectal Carcinoma Syndrome. In: *Cancer Research* 53, S. 5853–5855.
- Poetsch, Micaela; Petersmann, Astrid; Woenckhaus, Christian; Protzel, Chris; Dittberner, Thomas; Lignitz, Eberhard; Kleist, Britta (2004): Evaluation of allelic alterations in short tandem repeats in different kinds of solid tumors--possible pitfalls in forensic casework. In: *Forensic science international* 145 (1), S. 1–6. DOI: 10.1016/j.forsciint.2004.03.006.
- Promega Corporation (2016): Technical Manual PowerPlex® 16 System. The PowerPlex® 16 System Locus-Specific Information. Hg. v. Promega Corporation. Online verfügbar unter <http://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/101/powerplex%2016%20system%20protocol.pdf?la=en>.
- Pyatt, Robert; Chadwick, Robert B.; Johnson, Cheryl K.; Adebamowo, Clement; La Chapelle, Albert de; Prior, Thomas W. (1999): Polymorphic Variation at the BAT-25 and BAT-26 Loci in Individuals of African Origin. In: *The American Journal of Pathology* 155 (2), S. 349–353. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65131-0.
- Rajagopalan, Harith; Lengauer, Christoph (2004): Aneuploidy and cancer. In: *Nature* 432 (7015), S. 338–341. DOI: 10.1038/nature03099.
- Risinger, John I.; Berchuck, Andrew; Kohler, Matthew F.; Watson, Patrice; Lynch, Henry T.; Boyd, Jeff (1993): Genetic Instability of Microsatellites in Endometrial Carcinoma. In: *Cancer Research* 53, S. 5100–5103.
- Robert Koch-Institut; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hg.) (2015): Krebs in Deutschland 2011/2012. Robert-Koch-Institut; Gesellschaft der

epidemiologischen Krebsregister in Deutschland. 10. Ausg. Berlin (Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes).

Rubocki, Ronald J.; D, Ph; Duffy, Kelly J.; T, M.; Shepard, Kaye L.; McCue, Barbara J. et al. (2000): Loss of heterozygosity Detected in a Short tandem repeat (STR) Locus Commonly Used for Human DNA Identification. In: *Journal of Forensic Sciences* 45, S. 1087–1089.

Ruitberg, Christian M.; Reeder, Dennis J.; Butler, John M. (2001): STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. In: *Nucleic Acids Research* 29, S. 320–322.

Santos, Fabricio R.; Pandya, Arpita; Tyler-Smith, Chris (1998): Reliability of DNA-based sex tests. In: *Nature* (18), S. 103.

Senter, Leigha; Clendenning, Mark; Sotamaa, Kaisa; Hampel, Heather; Green, Jane; Potter, John D. et al. (2008): The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations. In: *Gastroenterology* 135 (2), S. 419–428. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.04.026.

Shannon, Catherine; Kirk, Judy; Barnetson, Rebecca; Evans, Justin; Schnitzler, Margaret; Quinn, Michael et al. (2003): Incidence of Microsatellite Instability in Synchronous Tumors of the Ovary and Endometrium. In: *Clinical Cancer Research* 9, S. 1387–1392.

Shen, Lanlan; Toyota, Minoru; Kondo, Yutaka; Lin, E.; Zhang, Li; Guo, Yi et al. (2007): Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (47), S. 18654–18659. DOI: 10.1073/pnas.0704652104.

Shia, Jinru (2015): Evolving approach and clinical significance of detecting DNA mismatch repair deficiency in colorectal carcinoma. In: *Seminars in diagnostic pathology* 32 (5), S. 352–361. DOI: 10.1053/j.semdp.2015.02.018.

Sieben, Nathalie L.G.; Natalja T.; Cornelisse, Cees J.; Fleuren, Gert Jan; Cleton-Jansen, Anne-Marie (2000): PCR artifacts in LOH and MSI analysis of microdissected tumor cells. In: *Human Pathology* 31 (11), S. 1414–1419. DOI: 10.1053/hupa.2000.20381.

Skotheim, Rolf I.; Diep, Chieu B.; Kraggerud, Sigrid M.; Jakobsen, Kjetill S.; Lothe, Ragnhild A. (2001): Evaluation of loss of heterozygosity/allelic imbalance scoring in tumor DNA. In: *Cancer Genetics and Cytogenetics* 127 (1), S. 64–70. DOI: 10.1016/S0165-4608(00)00433-7.

Somaschini, Alessio; Amboldi, Nadia; Nuzzo, Angelo; Scacheri, Emanuela; Ukmar, Giorgio; Ballinari, Dario et al. (2013): Cell line identity finding by fingerprinting, an optimized resource for short tandem repeat profile authentication. In: *Genetic testing and molecular biomarkers* 17 (3), S. 254–259. DOI: 10.1089/gtmb.2012.0359.

Steinke, Verena; Holzapfel, Stefanie; Loeffler, Markus; Holinski-Feder, Elke; Morak, Monika; Schackert, Hans K. et al. (2014): Evaluating the performance of clinical criteria for predicting mismatch repair gene mutations in Lynch syndrome: a comprehensive analysis of 3,671 families. In: *International journal of cancer* 135 (1), S. 69–77. DOI: 10.1002/ijc.28650.

Steinlechner, M.; Berger, B.; Niederstätter, H.; W. Parson (2002): Rare failures in the amelogenin sex test. In: *International Journal of Legal Medicine* (116), S. 117–120.

SWGDAM (2010): codis\_swgdam. Unter Mitarbeit von Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDAM). Hg. v. FBI's Laboratory Division.

- Tariq, Kanwal; Ghias, Kulsoom (2016): Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. In: *Cancer biology & medicine* 13 (1), S. 120–135. DOI: 10.28092/j.issn.2095-3941.2015.0103.
- Thibodeau, Stephen N.; Bren, G.; Schaid, D. (1993): Microsatellite Instability in Cancer of the Proximal Colon. In: *Science* 260, S. 816–819.
- Tomlinson, Ian P. M.; Lambros, Maryou B. K.; Roylance, Rebecca R. (2002): Loss of heterozygosity analysis: practically and conceptually flawed? In: *Genes, chromosomes & cancer* 34 (4), S. 349–353. DOI: 10.1002/gcc.10085.
- Tops, C. M.; Vasen, H. F.; van Berge Henegouwen, G.; Simoons, P. P.; van de Kluft, H. M.; van Leeuwen, S. J. et al. (1992): Genetic evidence that Turcot syndrome is not allelic to familial adenomatous polyposis. In: *American journal of medical genetics* 43 (5), S. 888–893. DOI: 10.1002/ajmg.1320430528.
- Traverso, Giovanni; Shuber, Anthony; Olsson, Louise; Levin, Bernard; Johnson, Constance; Hamilton, Stanley R. et al. (2002): Detection of proximal colorectal cancers through analysis of faecal DNA. In: *The Lancet* 359 (9304), S. 403–404. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)07591-8.
- Umar, A.; Boland, C. R.; Terdiman, J. P.; Syngal, S.; Chappelle, A. d. l.; Ruschoff, J. et al. (2004): Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. In: *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 96 (4), S. 261–268. DOI: 10.1093/jnci/djh034.
- Vasen, H.; Watson, Patrice; Mecklin, Jukka-Pekka; Lynch, Henry T. (1999): New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. In: *Gastroenterology* 116 (6), S. 1453–1456. DOI: 10.1016/S0016-5085(99)70510-X.
- Vauhkonen, Hanna; Hedman, M.; Vauhkonen, M.; Kataja, M.; Sipponen, P.; Sajantila, A. (2004): Evaluation of gastrointestinal cancer tissues as a source of genetic information for forensic investigations by using STRs. In: *Forensic science international* 139 (2-3), S. 159–167. DOI: 10.1016/j.forsciint.2003.10.016.
- Walsh, P. Sean; Fildes, N. J.; Reynolds, R. (1996): Sequence Analysis and Characterization of Stutter Products at the Tetranucleotide Repeat Locus VWA. In: *Nucleic Acids Research* 24 (14), S. 2807–2812. DOI: 10.1093/nar/24.14.2807.
- Wang, G.; Zhao, Y.; Liu, X.; Wang, L.; Wu, C.; Zhang, W. et al. (2001): Allelic loss and gain, but not genomic instability, as the major somatic mutation in primary hepatocellular carcinoma. In: *Genes, chromosomes & cancer* 31 (3), S. 221–227. DOI: 10.1002/gcc.1138.
- Wätzig, Hermann (2014): Grundlagen der Kapillarelektrophorese. Technische Universität Braunschweig. Online verfügbar unter <https://www.tu-braunschweig.de/pharmchem/forschung/waetzig/kpep>.
- Williams, Andrew S.; Huang, Weei-Yuarn (2013): The analysis of microsatellite instability in extracolonic gastrointestinal malignancy. In: *Pathology* 45 (6), S. 540–552. DOI: 10.1097/PAT.0b013e3283653307.

Wooster, Richard; Cleton-Jansen, A.-M.; Collins, N.; Mangion, J.; Cornelis, R. S.; Cooper, C. S. et al. (1994): Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. In: *Nature* 6, S. 152–156.

Wrba, Fritz; Dolznig, Helmut; Mannhalter, Christine (2007): Genetik verstehen. Grundlagen der molekularen Biologie. Wien: Facultas-Verl. (UTB Medizin, Naturwissenschaften, 8332).

Yuan, Lin; Chi, Yayun; Chen, Weixiang; Chen, Xiaochen; Wei, Ping; Sheng, Weiqi et al. (2015): Immunohistochemistry and microsatellite instability analysis in molecular subtyping of colorectal carcinoma based on mismatch repair competency. In: *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8, S. 20988–21000.

Zauber, Peter; Denehy, Thad R.; Taylor, Robert R.; Ongcapin, Emelie H.; Marotta, Stephen; Sabbath-Solitare, Marlene (2015a): Strong correlation between molecular changes in endometrial carcinomas and concomitant hyperplasia. In: *International journal of gynecological cancer* 25 (5), S. 863–868. DOI: 10.1097/IGC.0000000000000421.

Zauber, Peter; Marotta, Stephen; Sabbath-Solitare, Marlene (2015b): Colorectal Cancers with the Uncommon Findings of KRAS Mutation and Microsatellite Instability. In: *Cytogenetic and genome research* 146 (4), S. 261–267. DOI: 10.1159/000441086.

## 10 Anhang

Tabelle 27\*

Locus	Chromosomale Lokalisation	GenBank® Locus und Locus-Definition	Wiederholungssequenz 5' → 3'
VWA	12p13.31	HUMVWFA31, humanes von Willebrand Faktor Gen	TCTA Komplex
TH01	11p15.5	HUMTH01, humanes Tyrosin-hydroxylase-Gen	AATG
TPOX	2p24–2pter	HUMTPOX, humanes Thyroid-peroxidase Gen	AATG
CSF1PO	5q33.3–34	HUMCSF1PO, humanes c-fms Proto-Onkogen für CSF-1 Rezeptor Gen	AGAT
D5S818	5q23.3–32	nicht applikabel	AGAT
D13S317	13q22–q31	nicht applikabel	TATC
D7S820	7q11.21–22	nicht applikabel	GATA
D16S539	16q24.1	nicht applikabel	GATA
Amelogenin (Kein STR)	Xp22.1–22.3 and Y	HUMAMEL, humanes Y chromosomales Gen für das Amelogenin-like Protein	Nicht applikabel

\*= Quelle: (Promega Corporation 2016)

Tabelle 23: HROC32

Sample Name	VWA		TH01		TPOX		CSF1PO		AMEL
BcHROC32	19		8	9.1	7.3	10.3	10	14	f
HROC32P11	19		8	9.1	7.3	10.3		14	f
HROC32P42	19		8		7.3	10.3	15	14	f
HROC32T0M2	19		8	9.1	7.3	10.3		14	f
HROC32T3M1P17	19		8	9.1	7.3	10.3		14	f

Sample Name	D5S818		D13S317		D7S820		D16S539		
BcHROC32	11.1	12.3	14	15	8	11	10	11	
HROC32P11		12	14	15	8	11	10	11	
HROC32P42	10.1	11.1		15	8	11	10	11	
HROC32T0M2		11.1	14	15	8	10.3	10	11	
HROC32T3M1P17		12	14	15	8	11	10	11	

Tabelle A:

HROC18	VWA		TH01		TPOX		CSF1PO		AMEL	
DSMZ	17	17	7	8	8	8	12	12	X	X
MOI	17	17	7.1	8	7.3	7.3	12	12	X	X

HROC18	D5S818		D13S317		D7S820		D16S539		
DSMZ	9	11	11	11	8	11	12	13	
MOI	8	10.1	14	14	8	11	11	12.1	

Tabelle B:

HROC32	VWA		TH01		TPOX		CSF1PO		AMEL	
DSMZ	19	19	8	9	8	11	14	14	X	X
MOI	19	19	8	9.1	7.3	10.3	14	14	X	X

HROC32	D5S818		D13S317		D7S820		D16S539		
DSMZ	12	12	11	12	8	11	11	12	
MOI	12	12	14	15	8	11	10	11	

Tabelle C:

HROC24	VWA		TH01		TPOX		CSF1PO		AMEL	
DSMZ	16	20	6	9	11	11	11	12	X	Y
MOI	16	21	6.1	9.1	10.3	10.3	10	11	X	Y

HROC24	D5S818		D13S317		D7S820		D16S539		
DSMZ	10	11	7	13	11	13	9	11	
MOI	10	12	10	16	11	13	8	10	



Tabelle D:

HROC40	VWA		TH01		TPOX		CSF1PO		AMEL	
DSMZ	15	17	8	8	8	8	10	10	X	X
MOI	15	17	8	8	7.3	7.3	10	10	X	X

HROC40	D5S818		D13S317		D7S820		D16S539	
DSMZ	11	13	11	12	11	11	11	11
MOI	10.1	12.3	14	15	10.3	10.3	10	10

Tabelle 24: HROC46 und HROC224

Sample Name	VWA			TH01		TPOX			CSF1PO		AMEL
BcHROC46Pat	15	17		6.1	10	7.3	10.3		12		m
HROC46T0M1	15	17		6.1	10	7.3	12		12		m
HROC46T0M1#13P24	15	17		6.1	10	7.3	12		12		m
HROC46T2M1	15	17	o-l	6.1	10	7.3	12		12		m

Sample Name	D5S818			D13S317		D7S820			D16S539		
BcHROC46Pat	10.1	12.3			15	8	11			11	12.1
HROC46T0M1	10.1			12	16	-	10.3	12	10	11	
HROC46T0M1 korrigiert		12.3		14	15	8	10.3			11	12.1
HROC46T0M1#13P24		12.3			15	8	11			11	12.1
HROC46T2M1		12.3			15	8	11			11	12.1

Sample Name	VWA			TH01		TPOX			CSF1PO		AMEL
HROC224N	17	20.x	o-l	6.1	9.1	7.3			10	12	m
HROC224Tu	17	20.x		6.1	9.1	7.3			del	12	m
HROC224Met	17	20.x	o-l	6.1	9.1	7.3			10	12	m
HROC224T1M2	17	20		6.1	9	7.x				12	m

Sample Name	D5S818			D13S317		D7S820			D16S539		
HROC224N	10.1			12	16		11		10	11	
HROC224Tu	10.1			12	16		11	12	10	11	
HROC224Met	10.1			12	16		11		10.x	11	
HROC224T1M2	12.3			14	15	8	10.3			11	12.1
HROC224T1M2 korrigiert	10.1			12	16		10.3	12	10	11	

**Tabelle 25:** Allel-Anzahl und Allel-Größen für jeden STR-Locus, so wie sie an der DSMZ in Braunschweig verwendet werden.

Die regulären Fragmente sind normal, die Punktallele kursiv (meist dahinter) geschrieben. Aus: (Dirks et al. 2005)

Allele	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	vWA	TH01	TPOX	CSF1PO	Amelogenin
3						169			
4						173			209 = X
5		164	212	266		177, 180	220	287	215 = Y
6	114	168, 169	216, 219	270		181, 184	224	291	
7	118	172, 173	220, 223	274		185, 188	228	295	
8	122	176	224, 226	278		189, 192	232	299	
9	126	180	228, 229	282		193	236	303, 304	
9.3	(129)	(183)	(231)	(285)		196	(239)	(306)	
10	130	184	232, 233	286	118	197, 200	240	307, 310	
11	134	188	236, 237	290	122	201	244	311	
12	138	192	240, 241	294	126	205	248	315, 316	
13	142	196	244, 245	298	130		252	319	
14	146	200	248	302	134		256	323	
15	150	204	252	306, 309	138, 140			327	
16	154				142, 144			331	
17	158				146				
18					150, 152				
19					154				
20					158				
21					162				
22					166				
23					170				

**Tabelle 26:****MSI-Inzidenz bei unterschiedlichen sporadischen Tumorentitäten**

Aus: (Vauhkonen et al. 2004)

Tumorentität	MSI-Inzidenz (%)*
Ösophaguskarzinom	
Plattenepithelkarzinom	2 - 50
Adenokarzinom	22
Magen	2 - 15
Dünndarm	0
Kolorektales Karzinom	15
Gallenwege	0
Pankreas/Gallenwegs-	< 4
Hirn	0
Kopf und Hals	2 - 30
Schilddrüse	8 - 10
Lunge	
Nichtkleinzellig	4 - 68
Kleinzellig	0
Mamma	< 10
Ovarialkarzinom	11 - 17
Endometrium	9 - 45
Prostata	2 - 65
Harnwege	0 - 8

Sarkom	13 - 19
Melanom	5

\*= Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf MSI-H, wo dies möglich war.

D16S539, 16q22-24: non-coding region: 5'-GGG GGT CTA AGA GCT TGT AAA AAG; 5'-GTT TGT GTG TGC ATC TGT AAG CAT GTA TC.

D13S317, 13q22-q31: non-coding region: 5'-ACA GAA GTC TGG GAT GTG GAG GA; 5'-GGC AGC CCA AAA AGA CAG A.

D5S818, 5q21-q31: non-coding region, 5'-GGT GAT TTT CCT CTT TGG TAT CC; 5'-AGC CAC AGT TTA CAA CAT TTG TAT CT.

D7S820, 7q11.21-22: non-coding region, 5'-ATG TTG GTC AGG CTG ACT ATG; 5'-GAT TCC ACA TTT ATC CTC ATT GAC.

CSF1, 5q33.3-34: 3'-UTR of c-fms proto-oncogene for CSF-1 receptor gene, 5'-AAC CTG AGT CTG CCA AGG ACT AGC; 5'-TTC CAC ACA CCA CTG GCC ATC TTC.

TPOX, 2p23-2pter: intron 10 of human thyroid peroxidase gene, 5'-ACT GGC ACA GAA CAG GCA CTT AGG; 5'-GGA GGA ACT GGG AAC CAC ACA GGT TA.

TH01, 11p15-15.5: intron 1 of human tyrosine hydroxylase gene, 5'-ATT CAA AGG GTA TCT GGG CTC TGG; 5'-GTG GGC TGA AAA GCT CCC GAT TAT.

vWA, 12p12-pter: 3'-UTR of van Willebrandt factor gene, 5'-CTA GTG GAT GAT AAG AAT AAT CAG TAT GTG; 5'-GGA CAG ATG ATA AAT ACA TAG GAT GGA TGG.

Amel, Xp22.1-22.3, Y: coding region of amelogenin, 5'-ACC TCA TCC TGGG CAC CCT GGT T; 5'-AGG CTT GAG GCC AAC CAT CAG.

Abbildung 6: Genomische Lokalisation und STR-Primer-Sequenzen, so wie sie an der DSMZ in Braunschweig verwendet werden. Aus: Dirks et al. 2005. Der Bereich, in dem sich in der STRBase des NIST mit Stand Frühjahr 2013 zusätzliche Nukleotide finden, rot markiert. Die jeweiligen Nukleotide sind in der Primerliste im Kapitel „Material und Methoden“ dieser Arbeit ebenfalls farbig markiert.

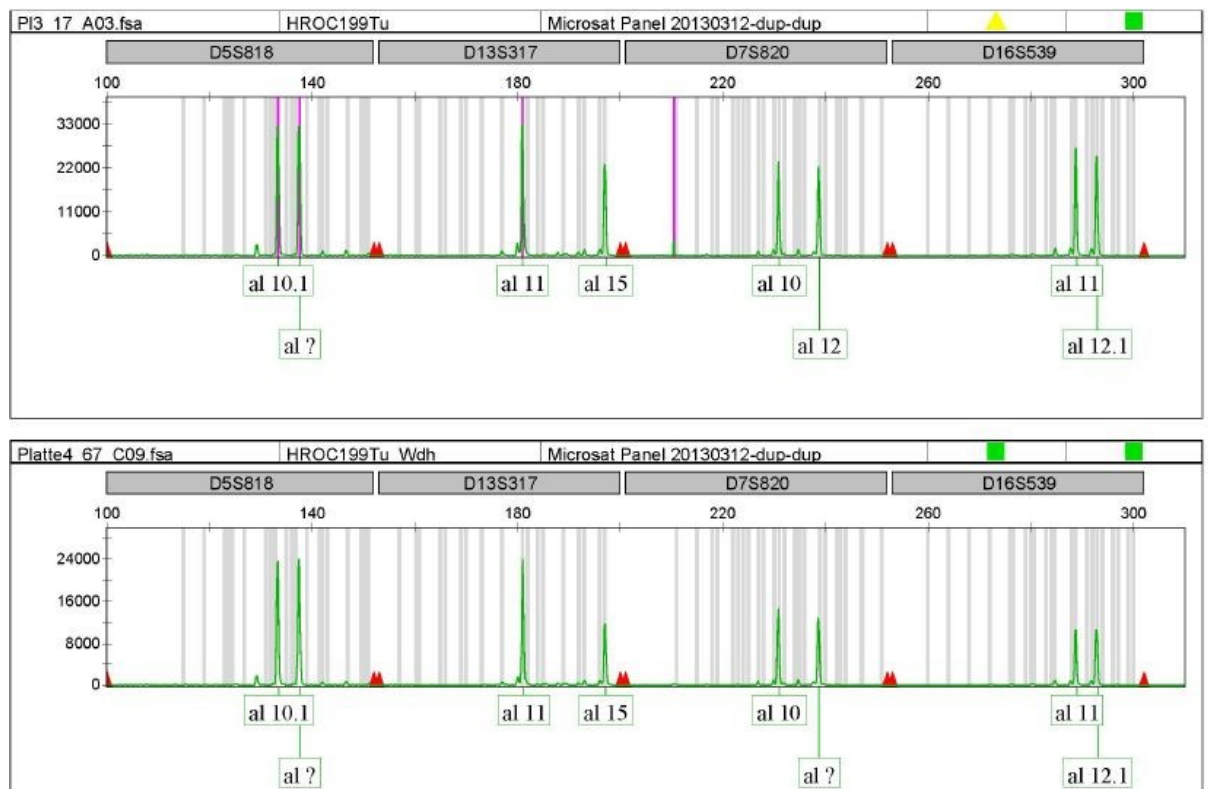


Abbildung 7: Zu technischen Artefakten. Die x-Achse der Elektropherogramme zeigt die Länge der PCR-Produkte in bp, die y-Achse die Peakhöhe in Fluoreszenzeinheiten. Das obere Elektropherogramm weist ein Artefakt bei D7S820 auf. HROC99Tu wurde reanalysiert. Im neuen Elektropherogramm (unten) ist der Extra-Peak nicht mehr zu sehen.

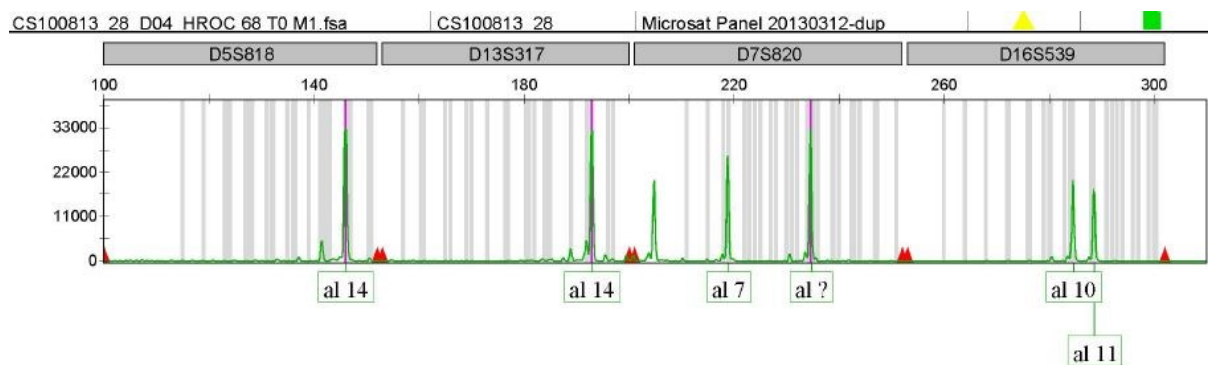


Abbildung 8: Elektropherogramm von HROC68TOM1. Der erste Peak im STR-System D7S820 zeigt das vermeintliche Allel D7S820<6. D7S820 weist in diesem Fall schon zwei Hauptallele auf, während D13S317 homozygot ist. Die roten Dreiecke stellen die Markergrenzen dar. Der Extrapeak (201bp) gehört zu D13S317 und ist das dortige Punktallel 17.

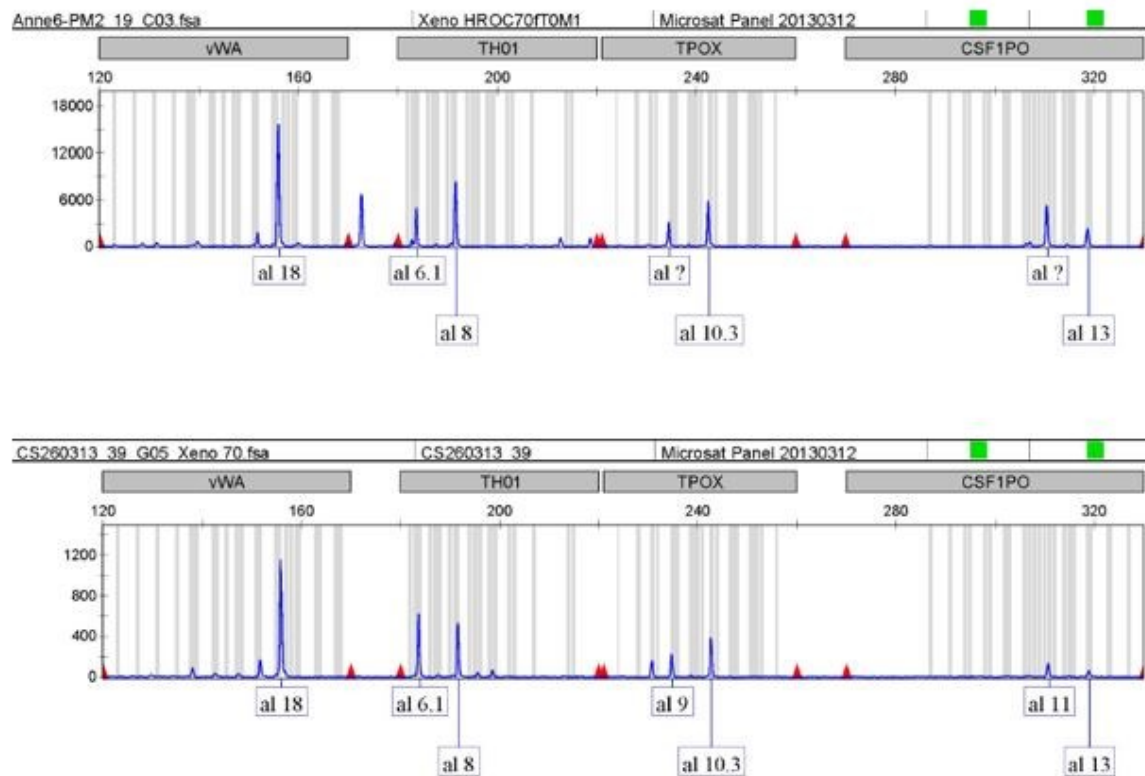


Abbildung 9: Xenotumor 70, zwei Elektropherogramme unterschiedlichen Datums. Das obere Elektropherogramm zeigt einen Peak zwischen den Markern vWA und TH01. Auf dem unteren Elektropherogramm ist dieser Extrapeak nicht zu sehen. Nebenbei sieht man am Beispiel dieser Proben, dass es manchmal von Vorteil ist, eine Probe erneut zu analysieren. Der kleine erste Peak bei TPOX ist kein neues Allel, er tritt bei der Reanalyse nicht mehr auf.

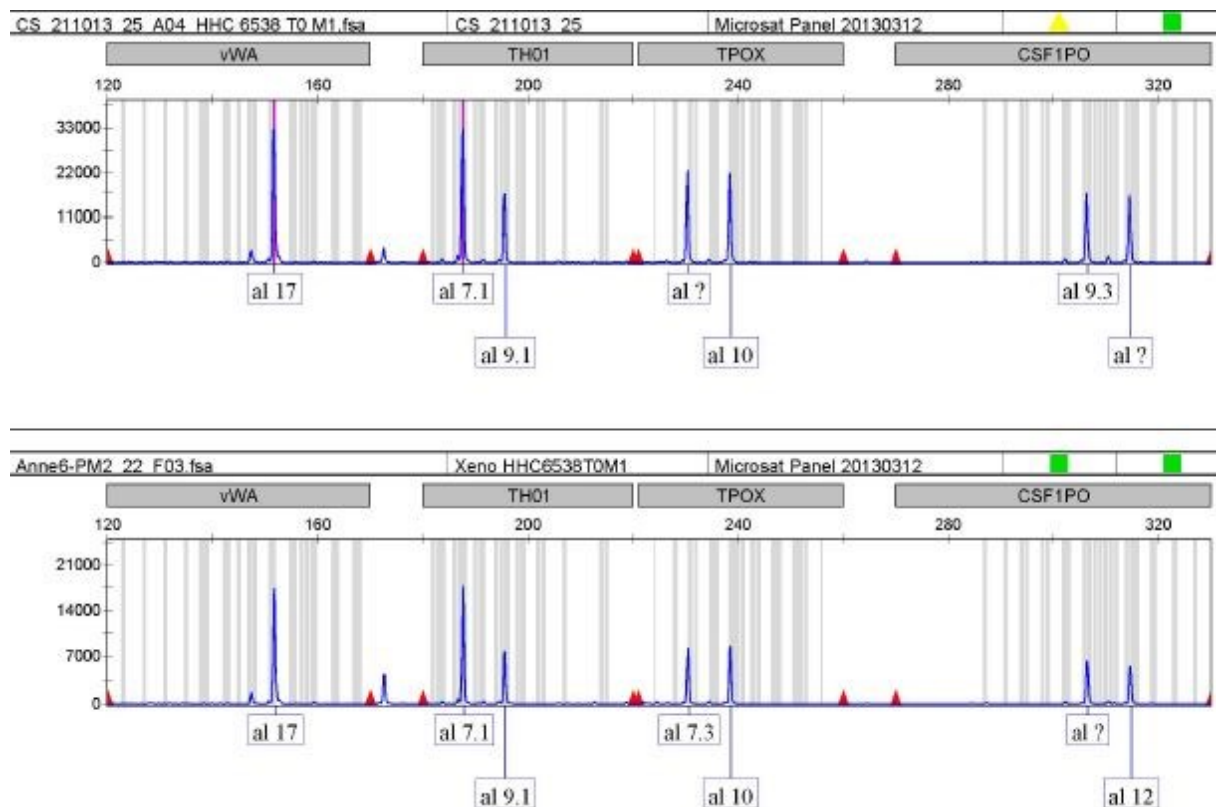


Abbildung 10: Probe HHC6538TOM1 wurde reanalysiert, in beiden Elektropherogrammen zeigt sich ein Peak im Bereich zwischen den Markergrenzen von vWA und TH01. Der Unterschied in der Peakhöhe hängt mit unterschiedlichen Einstellungen der y-Achse zusammen.

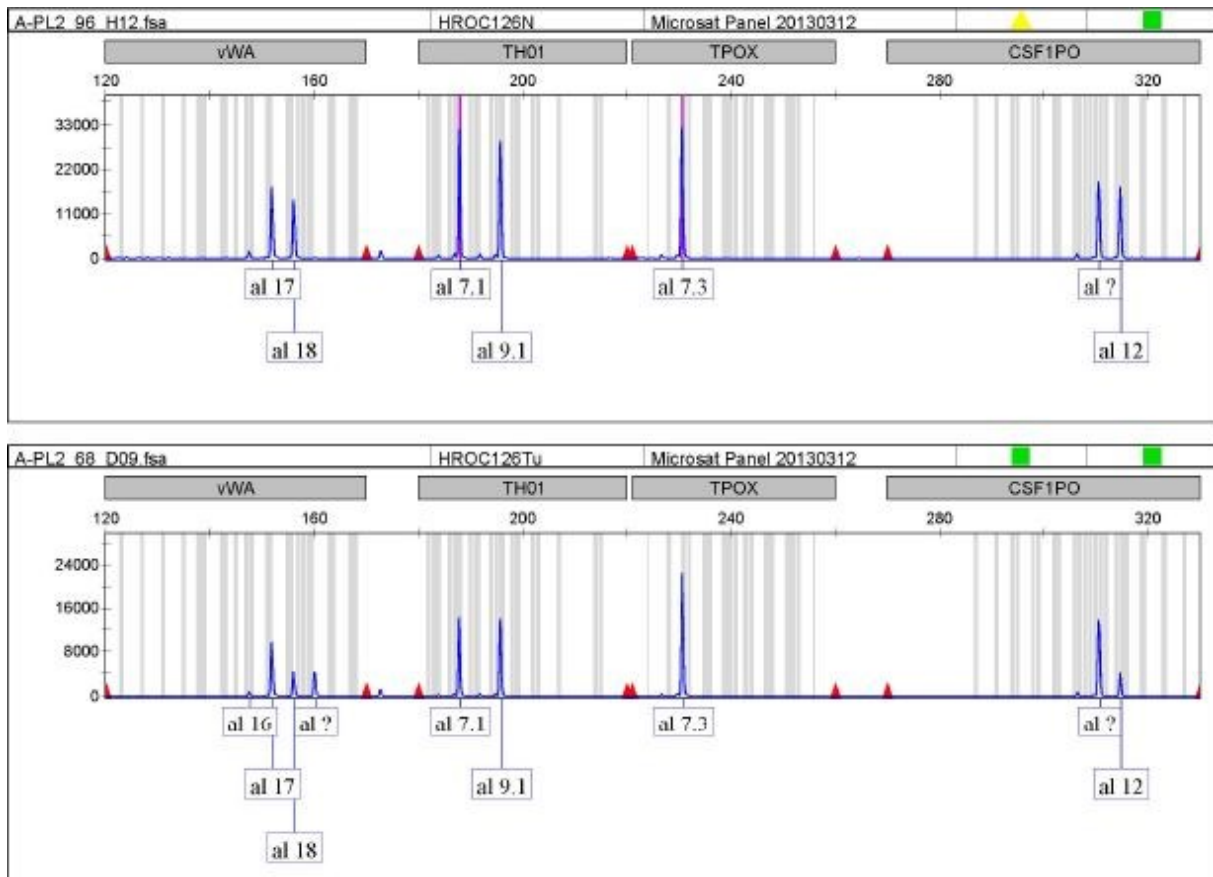


Abbildung 11: Elektropherogramme von vier STR-Loci zu HROC126. Das obere Elektropherogramm gehört zum Normalgewebe, das untere zum Tumormaterial. Die x-Achse zeigt die Länge der PCR-Produkte in bp, die y-Achse die Peakhöhe in Fluoreszenzeinheiten. Beim Marker vWA zeigt sich ein Fall von MSI. Das Ursprungsallel 18 wurde im Vergleich zum Normalgewebe kleiner, ein neuer Peak ist rechts von Allel 18 zu sehen. Beim Marker CSF1PO ist Allel 12 beim Tumormaterial deutlich kleiner als im Elektropherogramm des Normalgewebes. Hier zeigt sich ein Fall von LOH.



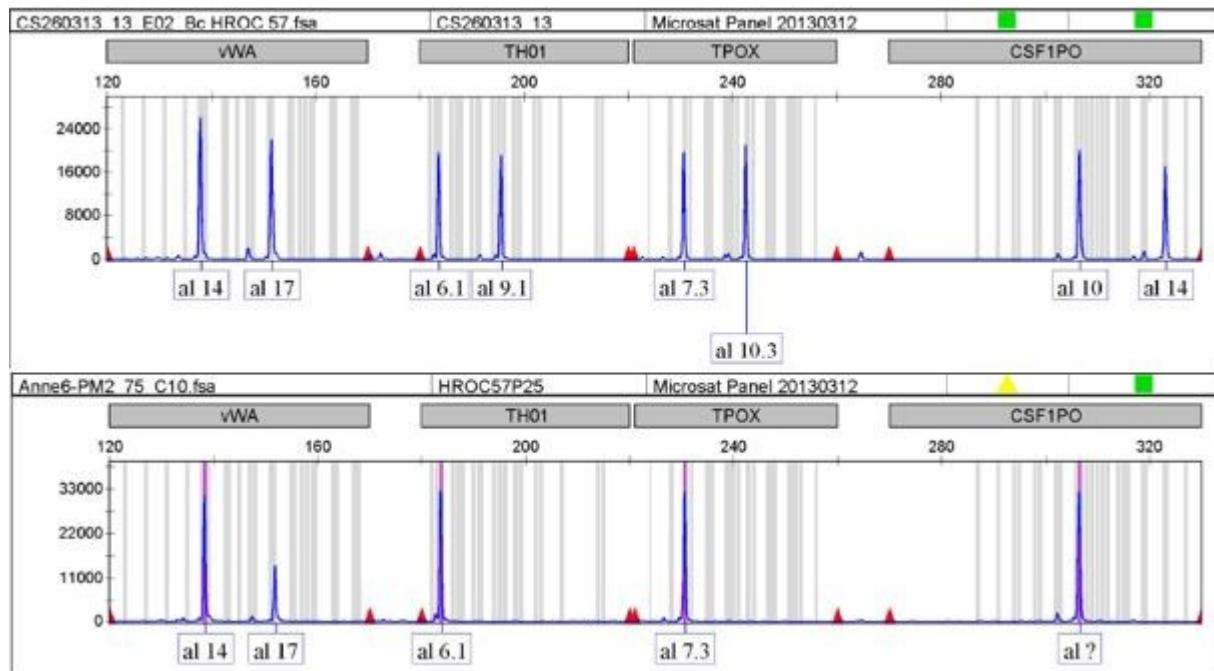


Abbildung 12: Elektropherogramm der HROC57 Krebszelllinie (unten). Beim Marker vWA zeigen sich unausgewogene Peak-Höhen. Zum Vergleich darüber das Elektropherogramm der FAM-gelabelten Marker für die HROC 57 B-Zellen. Hier finden sich bei vWA ausgewogene Peak-Höhen.

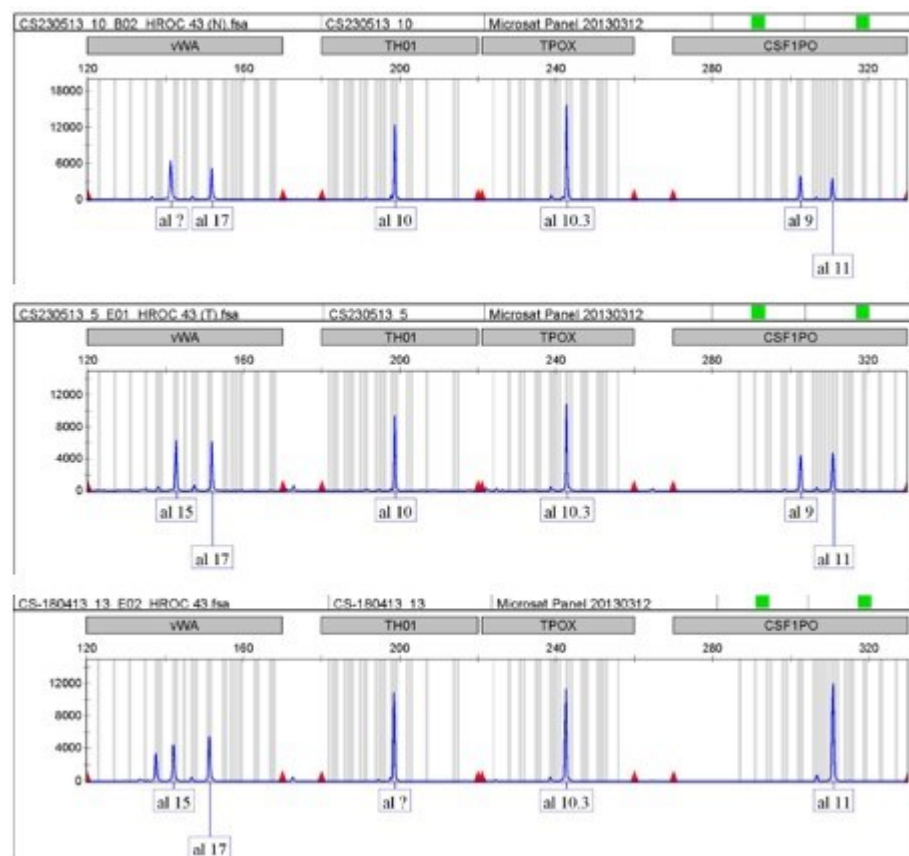


Abbildung 13: Untereinander dargestellt sind die Elektropherogramme von HROC43 Normalgewebe, Tumor und Tumorzelllinie (P30). Die x-Achse der Elektropherogramme zeigt die Länge der PCR-Produkte in bp, die y-Achse die Peakhöhe in Fluoreszenzeinheiten. Während CSF1PO bei N und T einen heterozygoten Genotyp aufweist, zeigt sich bei der Tumorzelllinie

ein homozygoter Genotyp. Dies ist ein Beispiel für LOH. Auch liefert die Tumorzelllinie beim Marker vWA ein Beispiel für das Auftauchen neuer Allele.

Die Quelle für die folgenden Auszüge: (Ruitberg et al. 2001), Stand 03/2013 für vWA, TH01, TPOX und CSF1PO. Stand 04/2013 für die übrigen Marker.

## VWA

Other Names	Chromosomal Location	GenBank Accession
vWF, VWA31A <u>UniSTS: 240640</u>	<b>12p13.31</b> ; von Willebrand Factor, 40 <sup>th</sup> intron Chr 12; 5.963 Mb (May 2004, NCBI build 35)	<u>M25858</u> ; has 18 repeat units

**Repeat:** [AGAT] = bottom strand (commonly used); [TCTA] with [TCTG] and [TCCA] inserts  
= GenBank top strand

Reported Primers	Ref.	PCR Primer Sequences
Set 1	113	5'-CCCTAGTGGATAAGAATAATC-3' 5'-GGACAGATGATAAATACATAGGATGGATGG-3'
Set 1'	7	5'-CCCTAGTGGATGATAAGAATAATCAGTATG-3' 5'-GGACAGATGATAAATACATAGGATGGATGG-3'
Set 2	Promega	<u>PowerPlex 1.1</u> , <u>PowerPlex 2.1</u> , <u>PowerPlex 16</u> (TMR labeled) <u>primer sequences</u> 5'-GCCCTAGTGGATGATAAGAATAATCAGTATGTG-3' 5'-[TMR]- GGACAGATGATAAATACATAGGATGGATGG-3'
Set 3	ABI	<u>Profiler Plus</u> (5-FAM labeled), <u>SGM Plus</u> (5-FAM labeled), <u>Identifiler</u> (NED labeled)

## PCR Product Sizes of Observed Alleles



<b>Allele (Repeat #)</b>	<b>Set 1, 1'</b>	<b>Set 2</b>	<b>Set 3</b>	<b>Repeat Structure</b>	<b><u>Ref.</u></b>
10	122 bp	123 bp	152 bp	TCTA TCTG TCTA [TCTG] <sub>4</sub> [TCTA] <sub>3</sub>	716
11 (13')*	126 bp	127 bp	156 bp	TCTA[TCTG] <sub>3</sub> [TCTA] <sub>7</sub>	76
12	130 bp	131 bp	160 bp	TCTA[TCTG] <sub>4</sub> [TCTA] <sub>7</sub>	7
13	134 bp	135 bp	164 bp	[TCTA] <sub>2</sub> [TCTG] <sub>4</sub> [TCTA] <sub>3</sub> TCCA[TCTA] <sub>3</sub>	716
13 (15)	134 bp	135 bp	164 bp	TCTA[TCTG] <sub>4</sub> [TCTA] <sub>8</sub> TCCA TCTA	76
13 (15'')	134 bp	135 bp	164 bp	TCTA[TCTG] <sub>4</sub> [TCTA] <sub>10</sub>	76
14 (16'')	138 bp	139 bp	168 bp	TCTA[TCTG] <sub>4</sub> [TCTA] <sub>11</sub>	76
14' (16''')	138 bp	139 bp	168 bp	TCTA [TCTA] <sub>1</sub> [TCTG] <sub>4</sub> [TCTA] <sub>3</sub> TCCA [TCTA] <sub>3</sub> TCTG	76
15 (17)	142 bp	143 bp	172 bp	TCTA[TCTG] <sub>4</sub> [TCTA] <sub>10</sub> TCCA TCTA	76
15 (17')	142 bp	143 bp	172 bp	TCTA[TCTG] <sub>3</sub> [TCTA] <sub>11</sub> TCCA TCTA	76
15.2	144 bp	145 bp	174 bp		7
16 (18)	146 bp	147 bp	176 bp	TCTA[TCTG] <sub>4</sub> [TCTA] <sub>11</sub> TCCA TCTA	76
16 (18')	146 bp	147 bp	176 bp	TCTA[TCTG] <sub>3</sub> [TCTA] <sub>12</sub> TCCA TCTA	76

16.1	147 bp	148 bp	177 bp		<b><u>variant allele</u></b>
17 (19)	150 bp	151 bp	180 bp	TCTA[TCTG] <sub>4</sub> [TCTA] <sub>12</sub> TCCA TCTA	76
18 (20)	154 bp	155 bp	184 bp	TCTA[TCTG] <sub>4</sub> [TCTA] <sub>13</sub> TCCA TCTA	76
18' (20')	154 bp	155 bp	184 bp	TCTA[TCTG] <sub>5</sub> [TCTA] <sub>12</sub> TCCA TCTA	76
18.1				TCTA[TCTG] <sub>4</sub> [TCTA] <sub>12</sub> A TCTA TCCA TCTA	1944
18.2	156 bp	157 bp	186 bp		<b><u>variant allele</u></b>
18.3	157 bp	158 bp	187 bp		<b><u>variant allele</u></b>
19 (21)	158 bp	159 bp	188 bp	TCTA[TCTG] <sub>4</sub> [TCTA] <sub>14</sub> TCCA TCTA	76
19.2					<b><u>variant allele</u></b>
20 (22)	162 bp	163 bp	192 bp	TCTA[TCTG] <sub>4</sub> [TCTA] <sub>15</sub> TCCA TCTA	76
21 (23)	166 bp	167 bp	196 bp	TCTA[TCTG] <sub>4</sub> [TCTA] <sub>16</sub> TCCA TCTA	76
22 (24)	170 bp	171 bp	200 bp	TCTA[TCTG] <sub>4</sub> [TCTA] <sub>17</sub> TCCA TCTA	76
23	174 bp	175 bp	204 bp		<b><u>variant allele</u></b>
24	178 bp	179 bp	208 bp		<b><u>variant allele</u></b>
25	182 bp	183 bp	212 bp		<b><u>variant allele</u></b>

**TH01**

Other Names	Chromosomal Location	GenBank Accession
HUMTH01, TC11 <u>UniSTS: 240639</u>	<b>11p15.5</b> ; intron 1 of human tyrosine hydroxylase gene Chr 11; 2.149 Mb (May 2004, NCBI build 35)	<u>D00269</u> ; has 9 repeat units

**Repeat:** [AATG] = bottom strand (commonly used); [TCAT] = GenBank top strand

Reported Primers	Ref.	PCR Primer Sequences
Set 1	1, 3	5'-GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT-3' (AATG strand) 5'-ATTCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG-3' (TCAT strand)
Set 2	4	5'-GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT-3' (AATG strand) 5'-GTGATTCCCATTTGGCCTGTTCTC-3' (TCAT strand)
Set 3	125	5'-GCTTCCGAGTGCAGGTCACA-3' (AATG strand) 5'-CAGCTGCCCTAGTCAGCAC-3' (TCAT strand)
Set 4	Promega	<u>PowerPlex 1.1</u> (TMR labeled) primer sequences 5'-ATTCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG-3' 5'-[TMR]-GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT-3'
Set 5	ABI	<u>COfiler</u> (JOE labeled), <u>SGM Plus</u> (NED labeled), <u>Identifiler</u> (VIC labeled)
Set 6	Promega	<u>PowerPlex 2.1</u> , <u>PowerPlex 16</u> (FL labeled) primer sequences 5'-[FL]-GTGATTCCCATTTGGCCTGTTCTC-3' 5'-ATTCCTGTGGGCTGAAAAGCTC-3'

**PCR Product Sizes of Observed Alleles**

Allele	Set 1, 4	Set 2	Set 3	Set 5	Set 6	Repeat Structure	Ref.
--------	----------	-------	-------	-------	-------	------------------	------

(Repeat #)							
3	171 bp	146 bp	230 bp	160 bp	152 bp	[AATG] <sub>3</sub>	290
4	175 bp	150 bp	234 bp	164 bp	156 bp	[AATG] <sub>4</sub>	716
5	179 bp	154 bp	238 bp	168 bp	160 bp	[AATG] <sub>5</sub>	76
5.3	182 bp	157 bp	241 bp	171 bp	163 bp		<u><i>variant allele</i></u>
6	183 bp	158 bp	242 bp	172 bp	164 bp	[AATG] <sub>6</sub>	76
6.1	184 bp	159 bp	243 bp	173 bp	165 bp		<u><i>variant allele</i></u>
6.3	186 bp	161 bp	245 bp	175 bp	167 bp	[AATG] <sub>3</sub> ATG[AA TG] <sub>3</sub>	632
7	187 bp	162 bp	246 bp	176 bp	168 bp	[AATG] <sub>7</sub>	76
7.1	188 bp	163 bp	247 bp	177 bp	169 bp		<u><i>variant allele</i></u>
7.3	190 bp	165 bp	249 bp	179 bp	171 bp		<u><i>variant allele</i></u>
8	191 bp	166 bp	250 bp	180 bp	172 bp	[AATG] <sub>8</sub>	76
8.3	194 bp	169 bp	253 bp	183 bp	175 bp	[AATG] <sub>5</sub> ATG[AA TG] <sub>3</sub>	76
9	195 bp	170 bp	254 bp	184 bp	176 bp	[AATG] <sub>9</sub>	76
9.1	196 bp	171 bp	255 bp	185 bp	177 bp		<u><i>variant allele</i></u>
9.3	198 bp	173 bp	257 bp	187 bp	179 bp	[AATG] <sub>6</sub> ATG[AA TG] <sub>3</sub>	76

10	199 bp	174 bp	258 bp	188 bp	180 bp	[AATG] <sub>10</sub>	76
10.3	202 bp	177 bp	261 bp	191 bp	183 bp	[AATG] <sub>6</sub> ATG[AA TG] <sub>4</sub>	76
11	203 bp	178 bp	262 bp	192 bp	184 bp	[AATG] <sub>11</sub>	76
12	207 bp	182 bp	266 bp	196 bp	188 bp	[AATG] <sub>12</sub>	112
13.3	214 bp	189 bp	273 bp	203 bp	195 bp	[AATG][ AACT][A ATG] <sub>8</sub> AT G[AATG] 3	377
14	215 bp	190 bp	274 bp	204 bp	196 bp		<i><u>variant allele</u></i>

## TPOX

Other Names	Chromosomal Location	GenBank Accession
hTPO, TPO <u>UniSTS: 240638</u>	<b>2p25.3</b> ; intron 10 of human thyroid peroxidase gene Chr 2; 1.472 Mb (May 2004, NCBI build 35)	<u>M68651</u> ; has 11 repeats

**Repeat:** [AATG] = GenBank top strand (commonly used)

Reported Primers	<u>Ref.</u>	PCR Primer Sequences
Set 1	153	5'-ACTGGCACAGAACAGGCACTTAGG-3' (AATG strand) 5'-GGAGGAACTGGGAACCACACAGGT-3' (TTAC strand)
Set 2	87	5'-CACTAGCACCCAGAACCGTC-3' (AATG strand) 5'-CCTTGTCAGCGTTTATTTGCC-3' (TTAC strand)

Set 3	Promega	<u>PowerPlex 1.1</u> (TMR labeled) <u>primer sequences</u> 5'-ACTGGCACAGAACAGGCACTTAGG-3' 5'-[TMR]-GGAGGAACTGGGAACCACACAGGTTA-3'
Set 4	ABI	<u>COfiler</u> (JOE labeled), <u>Identifiler</u> (NED labeled)
Set 5	Promega	<u>PowerPlex 2.1</u> , <u>PowerPlex 16</u> (TMR labeled) <u>primer sequences</u> 5'-GCACAGAACAGGCACTTAGG-3' 5'-[TMR]-CGCTCAAACGTGAGGTTG-3'

### PCR Product Sizes of Observed Alleles

<b>Allele (Repeat #)</b>	<b>Set 1,3</b>	<b>Set 2</b>	<b>Set 4</b>	<b>Set 5</b>	<b>Repeat Structure</b>	<b><u>Ref.</u></b>
4	216 bp	98 bp	209 bp	254 bp		<b><u>variant allele</u></b>
5	220 bp	102 bp	213 bp	258 bp		<b><u>variant allele</u></b>
6	224 bp	106 bp	217 bp	262 bp	[AATG] <sub>6</sub>	185
7	228 bp	110 bp	221 bp	266 bp	[AATG] <sub>7</sub>	284
7.3	231 bp	113 bp	224 bp	269 bp		<b><u>variant allele</u></b>
8	232 bp	114 bp	225 bp	270 bp	[AATG] <sub>8</sub>	28
9	236 bp	118 bp	229 bp	274 bp	[AATG] <sub>9</sub>	28
10	240 bp	122 bp	233 bp	278 bp	[AATG] <sub>10</sub>	28
10.1	241 bp	123 bp	234 bp	279 bp		<b><u>variant allele</u></b>
10.3	243 bp	125 bp	236 bp	281 bp	<u>1 bp deletion in flanking region</u>	<b><u>variant allele</u></b>
11	244 bp	126 bp	237 bp	282 bp	[AATG] <sub>11</sub>	28

12	248 bp	130 bp	241 bp	286 bp	[AATG] <sub>12</sub>	28
13	252 bp	134 bp	245 bp	290 bp	[AATG] <sub>13</sub>	284
13.1	253 bp	135 bp	246 bp	291 bp		<i><b><u>variant allele</u></b></i>
14	256 bp	138 bp	249 bp	294 bp	[AATG] <sub>14</sub>	153
15	260 bp	142 bp	253 bp	298 bp		<i><b><u>variant allele</u></b></i>
16	264 bp	146 bp	257 bp	302 bp		<i><b><u>variant allele</u></b></i>

## CSF1PO

Other Names	<u>Chromosomal Location</u>	GenBank Accession
CSF <u>UniSTS: 156169</u>	<b>5q33.1</b> ; human c-fms proto-oncogene for CSF-1 receptor gene, 6th intron Chr 5; 149.436 Mb (May 2004, NCBI build 35)	<u>X14720</u> ; has 12 repeats

**Repeat:** [AGAT] = GenBank top strand (commonly used)

Reported Primers	<u>Ref.</u>	PCR Primer Sequences
Set 1	3	5'-AACCTGAGTCTGCCAAGGACTAGC-3' (AGAT strand) 5'-TTCCACACACCACTGGCCATCTTC-3' (TCTA strand)
Set 2	Promega	<u>PowerPlex 1.1</u> (TMR labeled)
Set 3	ABI	<u>COfiler</u> (JOE labeled)
Set 4	Promega	<u>PowerPlex 16</u> (JOE labeled) primer sequences 5'-[ <b>JOE</b> ]-CCGGAGGTAAAGGTGTCTTAAAGT-3' 5'-ATTCCTGTGTCAGACCCTGTT-3'

Set 5	ABI	<u>Identifiler</u> (6FAM labeled with *mobility modifier)
-------	-----	---

**PCR Product Sizes of Observed Alleles**

<b>Allele (Repeat #)</b>	<b>Set 1 &amp; Set 2</b>	<b>Set 3</b>	<b>Set 4</b>	<b>Set 5*</b>	<b>Repeat Structure</b>	<b><u>Ref.</u></b>
5	287 bp	277 bp	317 bp	301 bp	[AGAT] <sub>5</sub>	<b><u>variant allele</u></b>
6	291 bp	281 bp	321 bp	305 bp	[AGAT] <sub>6</sub>	563
6.3	294 bp	284 bp	324 bp	308 bp		<b><u>variant allele</u></b>
7	295 bp	285 bp	325 bp	309 bp	[AGAT] <sub>7</sub>	153
7.3	298 bp	288 bp	328 bp	312 bp		<b><u>variant allele</u></b>
8	299 bp	289 bp	329 bp	313 bp	[AGAT] <sub>8</sub>	28
8.3	302 bp	292 bp	332 bp	316 bp		<b><u>variant allele</u></b>
9	303 bp	293 bp	333 bp	317 bp	[AGAT] <sub>9</sub>	28
9.1	302 bp	294 bp	334 bp	318 bp		<b><u>variant allele</u></b>
9.3	306 bp	296 bp	336 bp	320 bp		<b><u>variant allele</u></b>
10	307 bp	297 bp	337 bp	321 bp	[AGAT] <sub>10</sub>	28
10.1	308 bp	298 bp	338 bp	322 bp		<b><u>variant allele</u></b>
10.2	309 bp	299 bp	339 bp	323 bp		<b><u>variant allele</u></b>
10.3	310 bp	300 bp	340 bp	324 bp		563
11	311 bp	301 bp	341 bp	325 bp	[AGAT] <sub>11</sub>	28
11.1	312 bp	302 bp	342 bp	326 bp		<b><u>variant allele</u></b>



11.3	314 bp	304 bp	344 bp	328 bp		<b><u>variant allele</u></b>
12	315 bp	305 bp	345 bp	329 bp	[AGAT] <sub>12</sub>	28
12.1	316 bp	306 bp	346 bp	330 bp		<b><u>variant allele</u></b>
13	319 bp	309 bp	349 bp	333 bp	[AGAT] <sub>13</sub>	28
14	323 bp	313 bp	353 bp	337 bp	[AGAT] <sub>14</sub>	563
15	327 bp	317 bp	357 bp	341 bp	[AGAT] <sub>15</sub>	563
16	331bp	321 bp	361 bp	345 bp	[AGAT] <sub>16</sub>	<b><u>variant allele</u></b>

**D5S818**

Other Names	Chromosomal Location	GenBank Accession
D5 <u>UniSTS: 54700</u>	<b>5q23.2</b> Chr 5; 123.139 Mb (May 2004, NCBI build 35)	<u>G08446</u> ; has 11 repeat units <u>AC008512</u> ; has 11 repeat units

**Repeat:** [AGAT] = GenBank top strand

Reported Primers	Ref.	PCR Primer Sequences
Set 1	Promega	<u>PowerPlex 1.1</u> (FL labeled), <u>PowerPlex 16</u> (JOE labeled) <u>primer sequences</u> 5'-GGTGATTTTCCTCTTTGGTATCC-3' 5'-[JOE]-AGCCACAGTTTACAACATTGTATCT-3'
Set 2	453	5'-GGGTGATTTTCCTCTTTGGT-3' 5'-TGATTCCAATCATAGCCACA-3'
Set 3	ABI	<u>Profiler Plus</u> (NED labeled), <u>Identifiler</u> (PET labeled)

## PCR Product Sizes of Observed Alleles

Allele (Repeat #)	Set 1	Set 2	Set 3	Repeat Structure	Ref.
6	115 bp	129 bp	130 bp		<b><u>variant allele</u></b>
7	119 bp	133 bp	134 bp	[AGAT] <sub>7</sub>	721
8	123 bp	137 bp	138 bp	[AGAT] <sub>8</sub>	721
9	127 bp	141 bp	142 bp	[AGAT] <sub>9</sub>	721
10	131 bp	145 bp	146 bp	[AGAT] <sub>10</sub>	721
10.1	132 bp	146 bp	147 bp		<b><u>variant allele</u></b>
11	135 bp	149 bp	150 bp	[AGAT] <sub>11</sub>	721
11.1	136 bp	150 bp	151 bp		<b><u>variant allele</u></b>
12	139 bp	153 bp	154 bp	[AGAT] <sub>12</sub>	721
12.3	142 bp	156 bp	157 bp		<b><u>variant allele</u></b>
13	143 bp	157 bp	158 bp	[AGAT] <sub>13</sub>	721
14	147 bp	161 bp	162 bp	[AGAT] <sub>14</sub>	721
15	151 bp	165 bp	166 bp	[AGAT] <sub>15</sub>	721
16	155 bp	169 bp	170 bp		Profiler Plus
17	159 bp	173 bp	174 bp		<b><u>variant allele</u></b>
18	163 bp	177 bp	178 bp		<b><u>variant allele</u></b>

**D13S317**

Other Names	<u>Chromosomal Location</u>	GenBank Accession
D13 <u>UniSTS: 7734</u>	<b>13q31.1</b> Chr 13; 81.620 Mb (May 2004, NCBI build 35)	<u>G09017</u> ; has 13 repeats <u>AL353628.2</u> ; has 11 repeats

**Repeat:** [GATA] = bottom strand (commonly used); [TATC] = GenBank top strand

Reported Primers	<u>Ref.</u>	PCR Primer Sequences
Set 1	Promega	<u>PowerPlex 1.1</u> (FL labeled), <u>PowerPlex 16</u> (JOE labeled) primer sequences 5'-ATTACAGAAGTCTGGGATGTGGAGGA-3' 5'-[JOE]-GGCAGCCCCAAAAAGACAGA-3'
Set 2	453	5'-ACAGAAGTCTGGGATGTGGA-3' 5'-GCCCAAAAAGACAGACAGAA-3'
Set 3	ABI	<u>Profiler Plus</u> (NED labeled), <u>Identifiler</u> (VIC labeled)

**PCR Product Sizes of Observed Alleles**

Allele (Repeat #)	Set 1	Set 3	Repeat Structure	<u>Ref.</u>
5	157 bp	193 bp		<u><i>variant allele</i></u>
6	161 bp	197 bp		<u><i>variant allele</i></u>
7	165 bp	201 bp	[TATC] <sub>7</sub>	721
7.1	166 bp	202 bp		<u><i>variant allele</i></u>
8	169 bp	205 bp	[TATC] <sub>8</sub>	721
8.1	170 bp	206 bp		<u><i>variant allele</i></u>

9	173 bp	209 bp	[TATC] <sub>9</sub>	721
10	177 bp	213 bp	[TATC] <sub>10</sub>	721
10'	177 bp	213 bp	[TATC] <sub>10</sub> AATC	721
11	181 bp	217 bp	[TATC] <sub>11</sub>	721
11.1	182 bp	218 bp		<b><u>variant allele</u></b>
11.3	184 bp	220 bp		<b><u>variant allele</u></b>
12	185 bp	221 bp	[TATC] <sub>12</sub>	721
13	189 bp	225 bp	[TATC] <sub>13</sub>	721
13.3	192 bp	228 bp		<b><u>variant allele</u></b>
14	193 bp	229 bp	[TATC] <sub>14</sub>	721
14.3	196 bp	232 bp		<b><u>variant allele</u></b>
15	197 bp	233 bp	[TATC] <sub>15</sub>	721
16	201 bp	237 bp		<b><u>variant allele</u></b>
17	205 bp	241 bp		<b><u>variant allele</u></b>

**D7S820**

<b>Other Names</b>	<b><u>Chromosomal Location</u></b>	<b>GenBank Accession</b>
D7 <u>UniSTS: 74895</u>	<b>7q21.11</b> Chr 7; 83.433 Mb (May 2004, NCBI build 35)	<u>G08616</u> ; has 12 repeat units <u>AC004848</u> ; has 13 repeat units

**Repeat:** [GATA] = GenBank top strand

<b>Reported Primers</b>	<b><u>Ref.</u></b>	<b>PCR Primer Sequences</b>
Set 1	Promega	<u>PowerPlex 1.1</u> (FL labeled), <u>PowerPlex 16</u> (JOE labeled) <u>primer sequences</u> 5'-[JOE]-ATGTTGGTCAGGCTGACTATG-3' 5'-GATTCCACATTTATCCTCATTGAC-3'
Set 2	ABI	<u>Profiler Plus</u> (NED labeled), <u>COfiler</u> (NED labeled), <u>Identifiler</u> (6-FAM labeled)
Set 3	453	5'-TGTCATAGTTTAGAACGAACCTAACG-3' 5'-CTGAGGTATCAAAAACCTCAGAGG-3'

### PCR Product Sizes of Observed Alleles

<b>Allele (Repeat #)</b>	<b>Set 1</b>	<b>Set 2</b>	<b>Set 3</b>	<b>Repeat Structure</b>	<b><u>Ref.</u></b>
5	211 bp	253 bp	194 bp		<i><u>variant allele</u></i>
5.2					<i><u>variant allele</u></i>
6	215 bp	257 bp	198 bp	[GATA] <sub>6</sub>	721
6.2					<i><u>variant allele</u></i>
6.3	218 bp	260 bp	201 bp		<i><u>variant allele</u></i>
7	219 bp	261 bp	202 bp	[GATA] <sub>7</sub>	721
7.1					<i><u>variant allele</u></i>
7.3	222 bp	264 bp	205 bp		<i><u>variant allele</u></i>
8	223 bp	265 bp	206 bp	[GATA] <sub>8</sub>	721
8.1	224 bp	266 bp	207 bp		<i><u>variant allele</u></i>
8.2	225 bp	267 bp	208 bp		<i><u>variant allele</u></i>
8.3					<i><u>variant allele</u></i>

9	227 bp	269 bp	210 bp	[GATA] <sub>9</sub>	721
9.1	228 bp	270 bp	211 bp		<u><i>variant allele</i></u>
9.2					<u><i>variant allele</i></u>
9.3	230 bp	272 bp	213 bp		<u><i>variant allele</i></u>
10	231 bp	273 bp	214 bp	[GATA] <sub>10</sub>	721
10.1	232 bp	274 bp	215 bp		<u><i>variant allele</i></u>
10.3	234 bp	276 bp	217 bp		<u><i>variant allele</i></u>
11	235 bp	277 bp	218 bp	[GATA] <sub>11</sub>	721
11.1	236 bp	278 bp	219 bp		<u><i>variant allele</i></u>
11.3					<u><i>variant allele</i></u>
12	239 bp	281 bp	222 bp	[GATA] <sub>12</sub>	721
12.1	240 bp	282 bp	223 bp		<u><i>variant allele</i></u>
12.2					<u><i>variant allele</i></u>
12.3					<u><i>variant allele</i></u>

**D16S539**

Other Names	<u>Chromosomal Location</u>	GenBank Accession
D16 <u>UniSTS: 45590</u>	<b>16q24.1</b> Chr 16; 84.944 Mb (May 2004, NCBI build 35)	G07925; has 11 repeats AC024591.3; has 11 repeats

**Repeat:** [GATA] = GenBank top strand

<b>Reported Primers</b>	<b><u>Ref.</u></b>	<b>PCR Primer Sequences</b>
Set 1	Promega	<u>PowerPlex 1.1</u> (FL labeled), <u>PowerPlex 16</u> (JOE labeled) <u>primer sequences</u> 5'-GGGGGTCTAAGAGCTTGTAAGAAAG-3' 5'-[JOE]-GTTTGTGTGTGCATCTGTAAGCATGTATC-3'
Set 2	<u>CHLC Web Site</u>	5'-GATCCCAAGCTCTTCCTCTT-3' 5'-ACGTTTGTGTGTGCATCTGT-3'
Set 3	ABI	<u>COfiler</u> (5-FAM labeled), <u>SGM Plus</u> (5-FAM labeled)
Set 4	ABI	<u>Identifiler</u> (VIC labeled with *mobility modifier)

#### PCR Product Sizes of Observed Alleles

<b>Allele (Repeat #)</b>	<b>Set 1</b>	<b>Set 2</b>	<b>Set 3</b>	<b>Set 4*</b>	<b>Repeat Structure</b>	<b><u>Ref.</u></b>
4	260 bp	129 bp	229 bp	248 bp		<b><u>variant allele</u></b>
5	264 bp	133 bp	233 bp	252 bp	[GATA] <sub>5</sub>	721
6	268 bp	137 bp	237 bp	256 bp		<b><u>variant allele</u></b>
7	272 bp	141 bp	241 bp	260 bp		<b><u>variant allele</u></b>
8	276 bp	145 bp	245 bp	264 bp	[GATA] <sub>8</sub>	721
8.3	279 bp	148 bp	248 bp	267 bp		<b><u>variant allele</u></b>
9	280 bp	149 bp	249 bp	268 bp	[GATA] <sub>9</sub>	721
9.3	283 bp	152 bp	252 bp	271 bp		<b><u>variant allele</u></b>
10	284 bp	153 bp	253 bp	272 bp	[GATA] <sub>10</sub>	721
11	288 bp	157 bp	257 bp	276 bp	[GATA] <sub>11</sub>	721
11.3	291 bp	160 bp	260 bp	279 bp		<b><u>variant allele</u></b>
12	292 bp	161 bp	261 bp	280 bp	[GATA] <sub>12</sub>	721

12.1	293 bp	162 bp	262 bp	281 bp		<b><u>variant allele</u></b>
12.2	294 bp	163 bp	263 bp	282 bp		<b><u>variant allele</u></b>
13	296 bp	165 bp	265 bp	284 bp	[GATA] <sub>13</sub>	721
13.1	297 bp	166 bp	266 bp	285 bp		<b><u>variant allele</u></b>
13.3	299 bp	168 bp	268 bp	287 bp		<b><u>variant allele</u></b>
14	300 bp	169 bp	269 bp	288 bp	[GATA] <sub>14</sub>	721
14.3	303 bp	172 bp	272 bp	291 bp		<b><u>variant allele</u></b>
15	304 bp	173 bp	273 bp	292 bp	[GATA] <sub>15</sub>	721
16	308 bp	177 bp	277 bp	296 bp		<b><u>variant allele</u></b>



## 10.1 Thesen

1. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass bei Darmkrebszellen Veränderungen im Amelogenin-Locus sehr häufig vorkommen. Es handelt sich immer um den Verlust des Signals des Y-Chromosoms.
2. Auch zeigt sich bei den HROCs, dass LOH häufiger bei MSS und MSI-L Tumoren vorkommt als bei MSI-H-Tumoren.
3. LOH-Ereignisse sind meist nur bei einem einzigen der untersuchten Marker nachweisbar. Daher ist ein eindeutiger Identitätsnachweis trotz LOH-Ereignissen unter Verwendung dieses STR-Panels möglich.
4. Die Marker, die am häufigsten Keimbahnmutationen zeigen, sind auch die Marker, die bei den HROCs am meisten neue Allele aufweisen (vWA, CSF1PO, D13S317).
5. Zugewinn oder Verlust von Tetranukleotid-Repeat-Units tritt am häufigsten bei den längsten Repeat-Wiederholungen (Marker vWA) auf.
6. Wenn sich neue Allele zeigen, dann handelt es sich um einen Zugewinn oder Verlust von einer oder mehreren Tetranukleotid-Repeat-Units. Bei den HROC-Tumorproben kommen mehrheitlich Basenpaare hinzu, meist eine Repeat Unit (83%, es wurden auch Fälle von mehreren neuen Allelen an einem Locus nachgewiesen).
7. HROC-Tumorzelllinien unterschiedlicher Passagen weisen zumeist gleiche STR-Profile auf; Abweichungen lassen sich am besten durch schrittweise Veränderungen erklären.
8. Die STR-Profile von Tumor und Metastase können, müssen aber nicht übereinstimmen.
9. STR-Analysen erlauben eine korrekte Identitätsüberprüfung im Rahmen der experimentellen Forschung. MSI-H Fälle müssen sehr sorgfältig analysiert werden.
10. Multiple Proben, die von einem Patienten stammen, und unterschiedliche Passagen von Tumormodellen erleichtern die Zuordnung, da genetische Drifts schrittweise passieren und so besser nachvollzogen werden können.



### 10.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die eingereichte Dissertation mit dem Titel „Short Tandem Repeat-basierte Genotypisierung der HRO-Tumormodelle: Etablierung und Ergebnisse“ selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Auch versichere ich, dass die vorgelegte Dissertation bisher weder im Ausland noch im Inland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

---

Christina Stiller

## 10.4 Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn PD Dr. rer. nat. Michael Linnebacher für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit danken, die Dissertation in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen. Ihm danke ich auch für das Korrigieren der Arbeit und für die Betreuung, sei es nun in meiner Rostocker Zeit oder später über die Landesgrenzen hinweg.

Ich möchte auch dem gesamten Team des MOI-Labors ganz herzlich danken, allen voran Frau M. Sc. Saskia Stier und Frau Dr. rer. nat. Ulrike Klier, die während der praktischen Phase immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatten und mir Hilfestellung und Tipps für den Laboralltag gaben.

Ein großer Dank gilt auch Frau Dr. rer. nat. Claudia Maletzki für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit bei der wechselseitigen Nutzung eines Arbeitsgerätes.

Ich möchte Herrn Mathias Krohn danken für die geduldige Begleitung bei den ersten Schritten im Labor und ein offenes Ohr auch in späteren Phasen der Laborarbeit. Danke auch an Anne Lehmann für das Pipettieren einiger PCRs, wodurch mir umfangreichere Rohdaten zur Verfügung standen, und an Frau Dr. rer. nat. Christina Mullins für die Bereitstellung von Glioblastom-Proben und einem Fundament, auf das ich aufbauen konnte.

Ferner möchte ich Herrn Dr. phil. nat. Björn Schneider vom Institut für Pathologie der Universität Rostock für die Bearbeitung meiner Proben in der Kapillarelektrophorese danken, sowie für Rat und Informationen bezüglich des Gerätes. Danke auch an Herrn Dr. Dirks von der DSMZ für Anregungen und die Bereitstellung eines zentralen Papers.

Schließlich möchte ich meinen Eltern danken für ihr Vertrauen und die Unterstützung über all die Jahre hinweg. Ohne eure Hilfe wäre mein Studium nicht möglich gewesen: Danke!